

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Anatomie

Räumliches und zeitliches Expressionsmuster verschiedener
Transkriptionsfaktoren und deren Bedeutung für die Regulation von
Connexinen in der Prä- und frühen Postimplantationsphase der Maus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Nadine Melanie Ising
aus Essen
2003

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. E. Winterhager

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Esche

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Mai 2004

1 Einleitung

1.1	Die Bedeutung des extraembryonalen Gewebes	1
1.2	Connexine	2
1.2.1	Aufbau der Connexine	2
1.2.2	Expression und Funktion der Connexine	4
1.2.3	Connexin-defiziente Mausstämme	5
1.3	Expression der Connexine in der Embryonalentwicklung bei Nagern	5
1.4	Transkriptionelle Regulation der Connexinexpression	6
1.5	Posttranskriptionelle und posttranslationale Regulation der Connexine	8
1.6	Transkriptionsfaktoren und deren Bedeutung für die frühe Embryonalentwicklung der Nager	9
1.7	Zielsetzung	13

2 Material und Methoden

2.1	Verwendete Materialien	14
2.1.1	Für die in situ und whole mount in situ Hybridisierung verwendete cDNA-Sonden	14
2.1.2	Lösungen	14
2.1.3	Chemikalien und Utensilien	18
2.2	Versuchstiere und Gewebegewinnung	19
2.3	Vorbereitung für die Herstellung einer Cx43-mRNASonde	20
2.3.1	Polymerase Chain Reaction (PCR) von Cx43 und anschließende Klonierung	20
2.3.2	Geextraktion des PCR-Produkts von Cx43	21
2.3.3	Ligation des PCR-Produkts von Cx43 in pCRII und anschließende Transformation	22
2.4	Herstellung der mRNA-Sonden für die in situ Hybridisierung	23
2.5	Northern Blot zur Überprüfung der Sonden	24
2.5.1	Agarosegel-Elektrophorese mit Formaldehyd	24

2.5.2	Northern Blot (RNA-Transfer)	25
2.6	Nichtradioaktive in situ Hybridisierung (ISH)	25
2.6.1	Entparaffinisieren	26
2.6.2	In situ Hybridisierung	26
2.6.3	Whole mount in situ Hybridisierung	27
3	<u>Ergebnisse</u>	
3.1	Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren während der Prä- und Postimplantationsphase der Maus	29
3.1.1	Expression des Transkriptionsfaktors GATA-2	29
3.1.2	Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3	34
3.1.3	Expression des Transkriptionsfaktors Esx1	38
3.1.4	Expression des Transkriptionsfaktors Pem	42
3.1.5	Gegenüberstellung der Expressionsmuster der untersuchten Transkriptionsfaktoren	46
3.1.6	Tabellarische Gegenüberstellung der Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren	50
4	Diskussion	52
5	Zusammenfassung	63
6	Literatur	65

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung des extraembryonalen Gewebes

Am Tag 3.5dpc der Mausentwicklung kommt es nach der Kompaktion der Morula zur Bildung der Blastozyste. Hier erfolgt die erste Differenzierung der Zellen in zwei Kompartimente, den Embryoblasten und den Trophoblasten (Cross et al., 1994).

Die Blastozyste bildet am embryonalen Pol die innere Zellmasse (ICM) aus, die von einem einschichtigen Epithel, den Trophoblastzellen umgeben wird.

Der Anteil des Trophoblasten, der die ICM direkt umgibt nennt man polares Trophektoderm und die Anteile des Trophoblasten, die der ICM gegenüberliegen und das Blastozoel umgeben, werden als murales Trophektoderm bezeichnet.

Am Tag 4.5 pc erfolgt die Implantation der Blastozyste in das Endometrium. Hierzu tritt das murale Trophektoderm mit dem Uterusepithel in Kontakt. Nachdem der Trophoblast invasiv in das Endometrium vorgedrungen ist, wird er vom Uterusgewebe, der Implantationskammer, umschlossen. Neben seinen invasiven Eigenschaften, die streng durch ein endogenes Differenzierungsprogramm kontrolliert werden und durch die Dezidualisierung, produziert der Trophoblast Wachstumsfaktoren und Hormone (Rinkenberger et al., 1997).

Zur Ernährung des Embryos wird eine Plazenta benötigt. Diese gewährleistet bei den Säugetieren den Nährstoff- und Sauerstofftransport vom mütterlichen Blutkreislauf zu dem des Embryos, wobei eine strenge Trennung der beiden Kreisläufe durch die Plazentaschranke eingehalten wird. Weiterhin ist sie für die Produktion von Hormonen zur Erhaltung der Schwangerschaft verantwortlich. Bei der murinen Plazenta proliferieren die Zellen des polaren Trophoblasten und bilden das extraembryonale Ektoderm und den Ekto-plazentarkonus (EPC), während die muralen Trophoblastzellen sich zu primären Trophoblastriesenzellen differenzieren, die sich um die Implantationskammer herum anordnen (Cross et al., 1994). Die Trophoblastriesenzellen dringen weiterhin invasiv in das maternale Stromagewebe vor und arrodieren die mütterlichen Blutgefäße. Es entsteht die hämochoriale Plazenta, bei der die Trophoblastzellen im direkten Kontakt mit dem mütterlichen Blut stehen (Cross et al., 1994).

In der frühen Phase der Mausentwicklung wird der Embryo durch den Dottersack ernährt, dessen Aufgabe ab Tag 9.5 pc von der Plazenta übernommen wird.

Der Dottersack besteht aus einem viszeralen und einem parietalen Anteil. Der parietale Anteil setzt sich aus den Trophoblastriesenzellen und dem parietalen Endoderm, einem Derivat der ICM, zusammen. Die beiden Anteile des parietalen Dottersacks werden durch die Reichert'sche Membran getrennt (Rugh, 1990).

Der viszerale Dottersack besteht aus dem extraembryonalen Mesoderm und dem viszeralem Endoderm. Beide Anteile entspringen der ICM-Zelllinie. Die Zellen des Mesoderms differenzieren sich zu Hämangioblasten, die das erste primitive Zirkulationssystem zur Ernährung des Embryos bilden (Cross et al., 1994).

Im weiteren Verlauf der Entwicklung kommt es um den Tag 8,5 dpc zur Bildung der chorioallantoiden Plazenta. Diese entsteht durch die Fusion der Allantois mit der Chorionplatte, die sich aus dem extraembryonalen Ektoderm und dem EPC zusammensetzt (Müntener und Hsu, 1977). Ab Tag 10 pc sind die Plazentastrukturen erkennbar. Die Plazenta besteht aus dem chorioallantoiden Anteil, der Labyrinthschicht, dem Spongiotrophoblasten und einer Zone Trophoblastriesenzellen.

Das Labyrinth setzt sich aus embryonalen Trophoblastzellsträngen mit einem stromalen Kern zusammen, in deren Zwischenräumen mütterliches Blut fließt. Hier findet der Austausch von Nährstoffen zwischen der Mutter und dem Embryo statt. Der Spongiotrophoblast, sowie die Riesenzellen sind für die Produktion von Hormonen wie z.B. insulin-like-growth-factor-II (IGF-II) und Prolaktin verantwortlich, die das Wachstum des Fetus und die maternal-fetale Adaptation an die Schwangerschaft kontrollieren (Redline et al., 1993; Müller et al., 1998).

1.2 Connexine

1.2.1 Aufbau der Connexine

Bei den Connexinen handelt es sich um integrale Membranproteine, die die Bausteine von interzellulären Kanälen zweier benachbarter Zellen sind. Diese Kanäle nennt man gap junctions. Durch Röntgenstrukturanalyse und Elektronenmikroskopie hat man herausgefunden, dass die gap junctions aus zwei Halbkanälen, den Connexonen aufgebaut sind.

Diese Connexone sind wiederum aus jeweils sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen aufgebaut (Makowski et al., 1977). Die Connexine gehören zu einer Genfamilie aus bisher 19 identifizierten Mitgliedern (Willecke et al., 2002). Unterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedern lassen sich im Molekulargewicht und der Aminosäuresequenz finden; so richtet sich die Nomenklatur der Connexine nach dem Molekulargewicht, das aus der cDNA-Sequenz errechnet werden kann (Beyer et al., 1990). Weiterhin sind die Connexine durch Unterschiede in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften charakterisiert (Veenstra, 1996). Die Anordnung der Connexine erfolgt so, dass in ihrer Mitte eine Kanalpore entsteht. Auf diese Weise wird ein interzellulärer Spalt zwischen zwei aneinandergrenzenden Zellen von ca. 1.5nm überbrückt, so dass ein Austausch von Ionen, z.B. Natrium, Kalium, Chlorid

und Molekülen bis zu 1000 Dalton, wie Glucose, IP3, Kalzium oder zyklisches AMP stattfinden kann (Dermietzel, 1993).

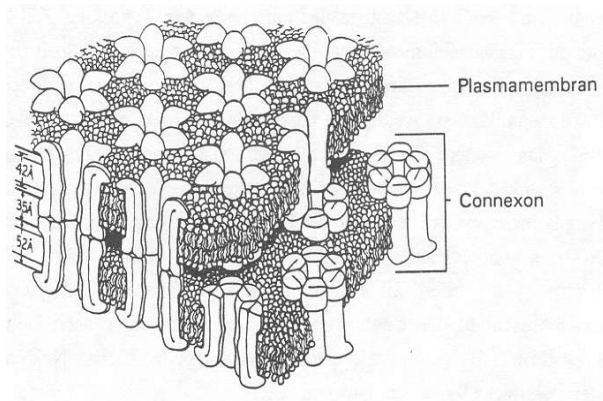


Abb. 1: Struktur der Connexine (Makowski et al., 1977)

Es ist weiter bekannt, dass ein Connexinprotein aus vier hydrophoben und fünf hydrophilen Anteilen besteht. Die hydrophoben Anteile werden von transmembranen Domänen gebildet, die hydrophilen Anteile aus zwei extrazellulären Domänen und aus dem intrazellulären gelegenen Carboxyl-Terminus, dem Amino-Terminus und der zytoplasmatischen Schleife. Die Verbindung der Connexone erfolgt mittels nicht kovalenter Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Schleifen zweier benachbarter Connexone (Willecke et al., 1991).

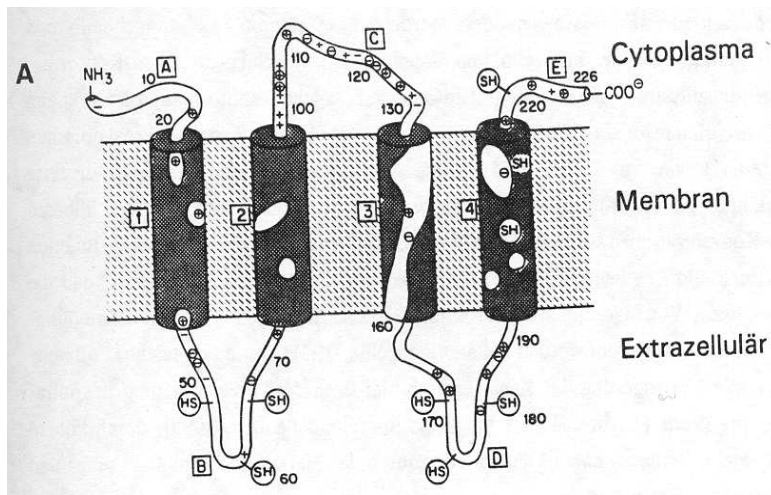


Abb. 2: Domänenstruktur der Connexine. A-E = hydrophile Anteile: A = intrazellulär gelegener Amino-Terminus, B und D = extrazelluläre Domänen, C = zytoplasmatische Schleife, E = intrazellulär gelegener Carboxyl-Terminus. 1-4 = hydrophobe transmembrane Domänen.

(Nicholson and Zhang, 1988)

1.2.2 Expression und Funktion der Connexine

Die für die Connexine codierenden Gene sind größtenteils nach einem einheitlichen Muster aufgebaut. Auf eine Promotorregion folgen zwei Exone, die durch ein Intron variabler Länge voneinander getrennt sind. Die für das Connexin codierende Region befindet sich hierbei ausschließlich im Abschnitt des Exon 2.

Bei Untersuchungen von Cx32 bei der Ratte und der Maus sowie beim Menschen, fand man heraus, dass Cx32 drei Exone besitzt und von zwei Promotoren aus transkribiert werden kann, so dass alternative Transkripte entstehen (Neuhaus et al., 1996; Sohl et al., 1996).

O'Brien et al. (1996) fanden des Weiteren für das Cx35 in der Retina des Rochen heraus, dass dieses Connexin ein Intron innerhalb der codierenden Region besitzt.

Connexine werden in unterschiedlichen Geweben, in adulten und embryonalen exprimiert. Die Zellen eines Gewebeverbandes können unterschiedliche Isoformen von Connexinen exprimieren, so dass es zum Teil zu einem überlappenden Expressionsmuster der Connexine kommt. Beispielsweise findet man Cx26 zusammen mit Cx32 in Hepatozyten und an Tag 12pc auch in Rattenhirn (Nicholson et al., 1987).

Connexine übernehmen wichtige biologische Funktionen innerhalb eines Zellverbandes. So bilden beispielsweise Cx43, das im Myokard für die Koordination des Kalziumstroms verantwortlich ist, und auch Cx40 elektrische Synapsen im Herzen, um die Reizleitung von den Atrien auf die Ventrikel zu gewährleisten (Suadiconi et al., 2000).

Einige Connexine weisen dabei eine Selektivität in Bezug auf die von ihnen zu transportierenden Ionen auf. So haben Cx43 und Cx40 eine höhere Permeabilität für Chloridionen als für Kaliumionen, wohingegen z.B. Cx32 diese Selektivität nicht aufzuweisen scheint (Elfgang et al., 1995; Veenstra et al., 1996).

Eine weitere wichtige Funktion ist die Ernährung des Mausembryos über das Labyrinth der Plazenta durch Cx26. Dieses wird zwischen dem Syncytiotrophoblast I und II exprimiert und dafür verantwortlich gemacht, dass Glucose von der maternalen zur embryonalen Seite transportiert wird (Takata et al., 1994; Shin et al., 1996).

Für die Cx26-Nullmutante fanden Gabriel et al. (1998), dass der transplazentare Glucosetransport reduziert ist und die Embryonen intrauterin um den zehnten Tag herum versterben.

Cx43-Nullmutante versterben kurz nach der Geburt an einer Dysmorphogenese und Obstruktion des Ausflusstrakts des rechten Herzens (Reaume et al., 1995).

Cx31-Nullmutanten weisen in ihren Plazenten ein reduziertes Labyrinth sowie eine stark reduzierte Spongiotrophoblastschicht auf. Allerdings hat man hier festgestellt, dass ein Fehlen

von Cx31 anscheinend durch andere Connexine, z.B. Cx43, sowohl im Embryo als auch in der adulten Maus, zum Teil kompensiert werden kann (Plum et al., 2001).

Der unterschiedliche Phänotyp der verschiedenen Connexin-defizienten Mauslinien belegt, dass den Connexinen eine vielfältige Rolle für die metabolische und regulatorische Eingliederung einer einzelnen Zelle in den Gewebeverband spielen.

1.3. Expression der Connexine in der Embryonalentwicklung bei Nagern.

In der Präimplantationsphase von Maus und Ratte findet man eine Expression von verschiedenen Connexingenen. Die Zellen der Blastozysten der Maus exprimieren Cx30, 30.3, 31, 31.1, 40, 43 und 45 (Davies et al., 1996; Dahl et al., 1996a), sowie Cx36 (Srinivas et al., 1999) und Cx57 (Manthey et al., 1999, Houghton et al., 2002). Interessanterweise sind sämtliche exprimierte Connexine sowohl in der ICM als auch im Trophektoderm ausgeprägt, allerdings werden hier nicht alle Connexine auch auf der Proteinebene exprimiert.

Die Ratte exprimiert zusätzlich zu den bei der Maus gefundenen Connexine Cx26 (Houghton et al., 2002).

Insbesondere die Expression von Cx31 und Cx43 unterliegen einer distinkten Regulation während des Implantationsvorgangs.

Während der Implantation kommt es zu einer Kompartimentisierung. Dabei wird Cx31 nur noch in Zellen exprimiert, die der Trophektodermzelllinie abstammen, also im EPC und im extraembryonalen Ektoderm, wohingegen Cx43 in Zellen der ICM-Zelllinie, also dem Embryo und dem viszerale Endoderm vertreten ist (Dahl et al., 1996 b; Reuss et al., 1996).

In der späteren Entwicklung findet man Cx31 und auch Cx43, dieses allerdings etwas schwächer exprimiert, im Spongiotrophoblasten der Plazenta (Reuss et al., 1996; Plum et al., 2001). Zusätzlich zum Spongiotrophoblasten wird Cx43 bei der Maus in den sekundären Trophoblastriesenzellen und ebenso in der dezidualen Kappe der Plazenta exprimiert (Pauken and Lo, 1995). Cx43 kann in der Cx31-defizienten Maus im Spongiotrophoblasten hochreguliert werden und anscheinend das Fehlen von Cx31 kompensieren (Plum et al., 2001).

Cx45 wird ebenfalls in Zellen der ICM-Zelllinie gefunden. Allerdings wird das Signal nach der Implantation sehr schwach und es zeigt sich nur noch eine minimale Immunreaktion im embryonalen Ektoderm (Houghton et al., 2002).

Cx26 lässt sich nach der Implantation in der Chorionplatte (Reuss et al., 1996), nach Fusion mit der Allantois, und im Labyrinth der Plazenta nachweisen, wobei die Kanäle zwischen den zwei mit Syncytiotrophoblast-Zellschichten ausgebildet werden (Risek and Gilula 1991;

Reuss et al., 1996) und für den transplazentaren Glucosetransport notwendig sind (Gabriel et al., 1998).

1.4. Transkriptionelle Regulation der Connexinexpression

Connexine können auf Transkriptionsebene über verschiedene Mechanismen kontrolliert werden, so z.B. durch alternatives splicing wie man es als Regulationsmechanismus bei Cx32 entdeckt hat. Dabei codiert das Exon 1a des Cx32 hauptsächlich für mRNA, die in der Leber nachweisbar ist und Exon 1b für mRNA, die vorzugsweise in Nervengewebe zu finden ist (Neuhaus et al., 1996).

Weiterhin können verschiedene Hormone die Expression der Connexine regulieren. Diese bilden mit einem für sie spezifischen Rezeptor einen Komplex, der dann zwecks der Genregulation an eine Bindungsstelle innerhalb des entsprechenden Gens bindet. Neuere Untersuchungen von Mitchell et al. (2001) zeigten, dass beispielsweise die Cx43-Expression in Osteoblasten möglicherweise durch die Bindung eines Parathormon (PTH)-Rezeptor-Komplexes an die entsprechende Bindungsstelle innerhalb des Promotors, aber auch an die 3' untranslatierte Region der mRNA (3'UTR), steuerbar ist.

Es ist weiterhin bekannt, dass die Regulation von Cx43 mit dem Östrogen-Progesteron-Konzentrationsverhältnis im Plasma assoziiert ist. Eine Suppression des Cx43-Gens wird durch Progesteron und eine Steigerung der Synthese von Östrogen bewirkt, auch Cx26 und Cx32 können unter dem Einfluss von Östradiol positiv reguliert werden (Petrocelli und Lye, 1993; Massas et al., 1998). Bei Cx43 geschieht dies zum einen durch eine direkte Transkriptionsregulation mittels Interaktion zwischen einem Ligand-Rezeptor-Komplex und so genannten Östrogen-response-elements (ERE's) in der Promoterregion, zum anderen wird eine indirekte Regulation durch Induktion der Transkriptionsfaktorensynthese vermutet (Weisz und Bresciani, 1988; Webb et al., 1990).

Hier stellen somit vor allem Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Form der Regulation von Connexinexpression dar.

Für eine Reihe von Connexinen wurden Promotoranalysen durchgeführt, um mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Connexinexpression beteiligt sein könnten, zu entdecken. So zeigt sich bei der Sequenzanalyse des Cx43-Gens der Maus im Promotor eine activator-Protein-1-site (AP-1-site), die an die fos/jun-Transkriptionsfaktorendimere binden kann. Weiterhin sind im Promotor, E-Boxen bekannt, die Anbindungsstellen für helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren (bHLH) sein können (Lefebvre et al., 1995).

Dahl et al. (1996 b) diskutierten eine mögliche Regulation von Cx43 durch den Transkriptionsfaktoren Octamer-4 (Oct-4), der zur POU-Familie gehört (Schöler, 1991), da beide ein ähnliches Expressionsmuster während der Mausentwicklung zeigten. Zusätzlich wurde Oct-4 mRNA in der Blastozyste entdeckt und Sequenzanalysen zeigten eine Oct-Bindungsstelle innerhalb des Cx43-Promotors (Lefebvre et al., 1995).

Bei der Analyse des Cx31-Gens der Ratte, das eine 93-prozentige Homologie zu dem des Maus-Connexingens zeigt, fanden Gabriel et al. (2001) unter anderem mögliche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren GATA-2 und GATA-3. Im proximalen Promotor und im Intron des Cx31-Gens der Maus, dem sowohl steigernde als auch inhibierende Wirkung auf Expression des Connexins nachgewiesen werden konnte (Plum, persönliche Kommunikation), sind mehrere mögliche Bindungsstellen für mammalian achaete-scute homologous (Mash)-2/E-factor-Dimere nachweisbar (Johnson et al., 1992). Untersuchungen mit cotransfizierten Rcho-1-Zellen der Trophoblastzelllinie ergaben allerdings, bei Überexpression von Mash-2 und GATA-3, keine Beeinflussung der Promotor- bzw. der Intronregion von Cx31. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere E-Boxen außerhalb der untersuchten Region vorhanden sind, die durch bHLH-Faktoren beeinflusst werden können. Untersuchungen zeigten eine Beeinflussung der Transkription in Hel37 und Rcho-1 Zellen durch das Intron von Cx31, ähnlich wie es auch schon in anderen Studien gezeigt wurde (Gabriel et al., 2001; Brinster et al., 1988). Von Cx26 der Maus liegen bis dato keine Veröffentlichungen über dessen Promotoranalysen vor, das murine Cx26 zeigt aber eine hohe Homologie mit dem humanen Cx26. Analysen der humanen Cx26-Sequenz zeigten Bindungsstellen für Sp1 und Sp3, sowie eine Oct-Bindungsstelle (Tu und Kiang, 1998). Zur Regulation von Cx40 durch Transkriptionsfaktoren zeigten sich bei Sequenzanalysen multiple putative Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (Seul et al., 1997).

1.5. Posttranskriptionelle und posttranslationale Regulation der Connexine

Connexine werden gewebspezifisch und sogar entwicklungsspezifisch exprimiert.

Die Kontrolle, der durch Connexine vermittelten physiologischen Gewebe- und Zellfunktionen, aber auch pathologischer Funktionen werden in der Proteinphosphorylierung vermutet (Sáez et al., 1998).

Die Phosphorylierung von Connexinen scheint somit die gap junction Kommunikation in verschiedenen Zellen zu kontrollieren. Fast alle Connexine beinhalten mögliche Phosphorylierungsstellen für verschieden Proteinkinasen, die innerhalb der Connexinfamilie

variieren können. Außer Cx26 könnten alle anderen bekannten Connexine phosphoryliert und anscheinend somit in ihrer Funktion reguliert werden (Alves et al., 2000).

Rosenberg et al. (1996) fanden Differenzen in der Cx-mRNA-Expression in Zelllinien, die charakteristisch für verschiedene Differenzierungsstadien der Leber waren. Die Cx43 und Cx26 mRNA-Mengen wurden geringer, im Gegensatz dazu stieg Cx32 mRNA während der Differenzierung der Hepatozyten an. Es wird vermutet, dass eine basale Menge an posttranslationaler Phosphorylierung an Serinresten von Cx43 für die Aktivierung und Funktion dieses Connexins verantwortlich ist (Musil et al., 1990). Cx43 besitzt drei mitogen-activated Proteinkinase-Bindungsstellen (MAP-Kinase-Bindungsstellen) im C-Terminus (Warn-Cramer et al., 1996). Lau et al. (1996), vermuteten eine Interaktion zwischen Cx43, einer Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosinkinase und der MAP-Kinase bei der Connexinregulation durch Proteinphosphorylierung. Bei einem Anstieg der cAMP-Konzentration und der Phosphorylierung an Serinresten, lässt sich eine Steigerung der gap junction-Kommunikation verzeichnen (Flagg et al., 1981). Eine Unterbrechung der Kommunikation ist mit einem Anstieg der Phosphorylierung an Tyrosin und/oder an Serin assoziiert (Brissette et al., 1991; Swenson et al., 1990).

Andere Formen der Regulation der Connexine können beispielsweise durch Zytokine, oder Neurotransmitter hervorgerufen werden.

Die Regulation der Connexine scheint auch vom Zelltyp, von dem sie exprimiert werden und ebenso von der Expression anderer Gene abhängig zu sein. Trosko et al., (1993) beschrieben eine Assoziation zwischen der Regulation von gap junction und der Expression von Tumorsuppressorgenen.

1.6 Transkriptionsfaktoren und deren Bedeutung für die frühe Embryonalentwicklung der Nagern

Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine, die die Transkription von Genen beeinflussen können. Diese Proteine können mit einer hohen Affinität an spezifische DNA-Sequenzen binden.

Dazu bedienen sich die Transkriptionsfaktoren bestimmter Struktur motive.

Zu den bekanntesten Struktur motiven zählen die Helix-loop-Helix-Struktur, die Motive der Zinkfingertranskriptionsfaktoren und die der Homöoboxgene.

Die Familie der basic-Helix-loop-helix-(bHLH)-Transkriptionsfaktoren reguliert die Determination und Differenzierung von verschiedenen Zelllinien, so z.B. während der Neurogenese und Myogenese (Atchley und Fitch, 1997).

Auch für die Entwicklung der Plazenta der Maus scheinen diese Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Hier sind besonders Mash-2 und Hand1 zu erwähnen, die an der Regulation der Trophoblastzelldifferenzierung beteiligt sind.

Mash-2 wird hierbei im Chorion und zusammen mit Hand1 im EPC exprimiert. Hand1 wird außerdem noch in den Trophoblastriesenzellen (giant cells, (GC)) exprimiert.

In Maus-Mutanten für Mash-2 zeigte sich, dass dieser Transkriptionsfaktor anscheinend für die Aufrechterhaltung des Spongiotrophoblasten benötigt wird. Es traten Missbildungen bei der Plazentabildung auf, diese schlossen ein: ein Fehlen des Spongiotrophoblasten, eine übermäßige Anzahl von GC und ein unterentwickeltes Labyrinth (Guillemot et al., 1994; Tanaka et al., 1997).

Bei den Hand1-Nullmutanten kommt es, an Tag 7.5pc aufgrund einer Blockierung der GC-Differenzierung und einem zu kleinem EPC, zu einem Stillstand der Entwicklung (Riley et al., 1998).

Um die Transkription von Genen steuern zu können bilden Mash-2 und auch Hand1 Heterodimere mit E-Faktoren mittels ihrer bHLH-Domäne. So werden die Basisdomänen befähigt an die DNA zu binden (Voronova et al., 1990).

Mash-2-E-Faktor-Dimere aktivieren die Transkription über eine E-Box mit der Sequenz CANNTG, während Hand1-E-Faktor-Komplexe an die Consensussequenz NNTCTG binden (Hollenberg et al., 1995).

Die Funktion der E-Faktoren kann durch Id-Proteine, bei denen es sich um HLH-Proteine mit fehlender DNA-Bindungsdomäne handelt, inhibiert werden (Cross et al., 2001).

Andere bHLH-Proteine beinhalten ein so genanntes Leucinzipper (LZ)-Dimerizationsmotiv, das durch eine Wiederholung von Leucinresten charakterisiert ist (Atchley and Fitch., 1997).

Eine andere Gruppe regulierender Proteine sind die Zinkfingertranskriptionsfaktoren, die mittels einer hoch konservierten DNA-Bindungsdomäne aus zwei Zinkfingeratomen und zwei benachbarten Aminosäureketten ihre Funktion ausüben (Molkentin, 2000). Hierbei sind besonders GATA-Faktoren und Mitglieder der Snail-Familie zu nennen.

Zu den Aufgaben GATA-Gen-Familie, zu der sechs Mitglieder zählen, die sich in zwei Untergruppen aufteilen lassen, gehört die Beteiligung an diversen Zelldifferenzierungen während der Entwicklung von Geweben (Simon et al., 1995).

Zu der einen Untergruppe zählen GATA-1, -2 und -3. Diese Faktoren spielen besonders eine Rolle bei der Spezifizierung und Differenzierung von hämatopoetischen Zelllinien aber auch bei Regulation von trophoblastspezifischen Genen (Tsai et al., 1994; Ting et al., 1996). Die andere Untergruppe beinhaltet die Faktoren GATA-4, -5 und -6, welche zur Regulation der

Entwicklung von Herz und Bauchorganen beitragen (Laverriere et al., 1994). Bedeutend sind die GATA-Faktoren auch für die frühe Entwicklung extraembryonalen Gewebes bei der Maus. GATA-6 konnte in der Blastozyste der Maus und nach der Implantation im parietalen Endoderm sowie im Meso- und Endoderm von Herz und Darm nachgewiesen werden. Eine Inaktivierung dieses Faktors hat den frühen Tod um den Tag 5.5pc zur Folge (Koutsourakis et al., 1999).

Auch GATA-2 und -3 spielen eine Rolle für das extraembryonale Gewebe. Sie werden in GC exprimiert und regulieren hier die Expression verschiedener plazentarer Hormone, so z.B. Prolaktin-I (PL-I). Ebenso haben diese Faktoren einen Einfluss auf die Expression des Proliferogens, wie an einer transfizierten Trophoblastzelllinie festgestellt wurde (Ma et al., 1997). Weitere Expression findet sich für beide im EPC sowie in der Plazenta der Maus (Ng et al., 1994).

Die Untergruppe GATA-1, -2, -3 dieser Transkriptionsfaktoren, reguliert die Genexpression hauptsächlich, indem sie an den DNA-Consensus (A/T) GATA (A/G) binden. GATA-2 und GATA-3 sind auch fähig an die Sequenz AGATCTT binden.

Über GATA-1 ist bekannt, dass er mit der den Basenpaaren so interagiert, dass der N-Terminus und der zentrale Anteil der GATA-Bindungsdomäne einen spezifischen Kontakt innerhalb der großen DNA-Furche bilden, während der C-Terminus eine spezifische Bindung in der kleinen DNA-Furche schafft (Omichinski et al., 1993). Wohingegen bei in vitro Versuchen nur der C-Terminus und benachbarte Domänen notwendig für die DNA-Bindung zu sein scheinen (Omichinski et al., 1993; Visvader et al., 1995).

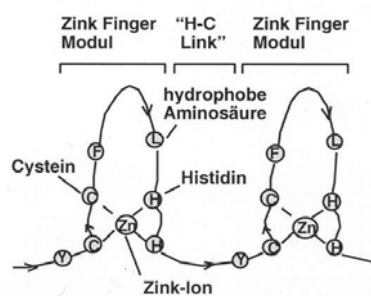


Abb. 3: Schema einer Zinkfingerdomäne. Ein konservierter H/C-Link verbindet zwei Zinkfinger-Module. Die Koordination der Zinkionen erfolgt über Cystein/Histidin-Seitenketten. Weitere Aminosäuren bilden eine hydrophobe Struktur (nach Romaniuk, 1985)

Eine weitere Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die Homöoboxfaktoren oder Homöoboxgene, zu denen auch *Pem* und *Esx1* zählen, spielen eine wichtige Rolle bei embryonalen Entwicklungsprozessen, eingeschlossen sind dabei die Entwicklung der embryonalen Achse und die Organogenese (Lin et al., 1994). Ein Mechanismus, mit dem die

homöodomänen beinhaltenden Proteine ihre regulatorischen Einflüsse in der Entwicklung geltend machen können, ist beispielsweise die Modulation der Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Goomer et al., 1994; Valarché et al., 1993; Yokouchi et al., 1995). Sie übernehmen aber auch Aufgaben in adulten Geweben, allerdings sind hier die Funktionen noch nicht abschließend geklärt.

Das paired-like Homöoboxgen *Esx1* besteht aus vier Exons, die durch zwei Introns unterbrochen sind. Dabei codieren die letzten drei Exons für die Homöobox (Maiti et al., 1996). Yan et al. (2000) identifizierten im *Esx1*-Protein ein so genanntes PF/PN-Motiv, dem sie eine inhibierende Wirkung auf die nukleäre Lokalisation und die DNA-Bindungsaktivität von *Esx1* zuschrieben. *Esx1* ist während der embryonalen Entwicklung der Maus ausschließlich in extraembryonalen Geweben, wie z.B. dem EPC, dem Chorion und der Labyrinthschicht der Plazenta, exprimiert. Im adulten Gewebe wird es in Keimzellen des Hodens gefunden (Li et al., 1997). Die besondere Bedeutung dieses Homöoboxgens für die Ausbildung der extraembryonalen Strukturen während der Entwicklung der Maus zeigten sich bei Versuchen mit „knock out“-Mäusen. Hierbei wurde festgestellt, dass die Plazenten dieser Tiere ödematös und somit größer und schwerer waren, als die Kontrollplazenten vom Wildtyp. Besonders der Spongiotrophoblast und die sekundären GC waren in den Plazenten der Mutanten stärker ausgebildet. Ebenfalls fiel ein Defekt der Vaskularisierung innerhalb der Labyrinthschicht auf. Diese Defekte der Plazenta korrelieren, im Vergleich zum Wildtyp, mit einer Wachstumsretardierung der Feten, die während ihrer Entwicklung über diese Plazenten ernährt wurden. Diese Ergebnisse lassen auf eine Regulation der Morphogenese des Labyrinths und der Differenzierung von Labyrinth und Spongiotrophoblast schließen (Li and Behringer, 1998).

Die Struktur des Pem-Homöoboxgens ist wenig verwandt mit anderen Mitgliedern der Homöoboxgenfamilie. Es entspricht am ehesten der Struktur der so genannten paired-like Klassifizierung (Lin et al., 1994; Maiti et al., 1996).

Es zeichnet sich durch eine rasche Weiterentwicklung im Aminosäureanteil der Helices I und II und deren Verbindung in der Homöodomäne aus. Während die dritte Helix, die wahrscheinlich wie bei anderen Homöoboxfaktoren, für die Anbindung an die DNA verantwortlich ist, stark konserviert ist (Sutton and Wilkinson, 1997).

Das Pem-Protein kann in pluripotenten embryonalen Stammzellen der Zelllinie D3, in Teratocarcinomzellen der Zelllinie D9 und per Northern blot in immortalisierten und transformierten Zelllinien lymphoiden, mesenchymalen, myeloiden, neuroblastoiden und epithelialen Ursprungs nachgewiesen werden (MacLeod et al., 1990a; Wilkinson et al., 1990).

In adultem Gewebe findet es sich nur in den Sertolizellen des Hodens, den Granulosazellen des Ovars und in Kupfferzellen der Leber.

Während der Entwicklung der Maus wird es zunächst in der ICM und im Trophektoderm der Blastozyste exprimiert. Nach der Implantation konzentriert sich die Expression dann vornehmlich auf das extraembryonale Gewebe. So z.B. im EPC und im parietale bzw. viszerale Ektoderm (Lin et al., 1994). Um die Zeit der Plazentaentwicklung findet man Pem auch im Spongiotrophoblasten, dem Labyrinth und den GCs (Pitman et al., 1998).

Pem-defiziente Mäuse wiesen eine normale Fertilität auf und auch die Funktion der Kupfferzellen der Leber wurde nicht beeinflusst. Es konnte auch kein Unterschied zwischen der Entwicklung der extraembryonalen Strukturen bei Mäusen mit Wildtyp oder mutiertem Pem-Allel festgestellt werden, woraus man schloss, dass Pem nicht essentiell für die normale Entwicklung der extraembryonalen Strukturen ist.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters ausgewählter Transkriptionsfaktoren (GATA-2, GATA-3, Esx1 und Pem) während der frühen Embryonalentwicklung der Maus. Insbesondere sollte das räumliche und zeitliche Muster dieser Transkriptionsfaktoren vor und nach der Implantation des Embryos evaluiert werden. Hierzu wurden mRNA-Sonden der Transkriptionsfaktoren hergestellt, die dann in der, im Rahmen der Doktorarbeit etablierten, nichtradioaktiven in situ Hybridisierung angewendet wurden.

Weiterhin sollte eine mögliche Korrelation zwischen dem Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren und den Mustern der für die in der frühen Entwicklung der Maus exprimierten Connexingene herausgearbeitet werden.

Hierbei stand die Frage nach Transkriptionsfaktoren und deren mögliche Beteiligung an der Regulation von Connexinen, z.B. während des „sorting out“ von Cx31 und Cx43 nach der Implantation, im Vordergrund. Besondere Hinweise auf die Regulation der Connexine durch Transkriptionsfaktoren gaben überlappende Expressionsmuster von Mash-2 und Cx31 während der Präimplantationsphase, im EPC und im Spongiotrophoblasten, (Guillemot et al., 1994; Nakayama et al., 1997; Rossant et al., 1998), in Verbindung mit multiplen Bindungsstellen für Mash-2/E-Faktor-Dimere innerhalb des proximalen Promotors und des Introns im Cx31-Gen (Plum et al., 2001). Auch mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in Genen anderer Connexine wie Cx43 und Cx26, die in der frühen

Embryonalentwicklung der Maus eine Rolle spielen, lassen eventuell auf eine Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an deren Regulation schließen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Für die in situ und whole mount in situ Hybridisierung verwendete cDNA-Sonden

r Cx31:	880bp Fragment aus Exon 2 des Ratten Cx31-Gens, einkloniert in pBluescript SK (+/-)-Vektor (Reuss)
mCx43:	820bp Fragment des Maus Cx43-Gens, einkloniert über EcoRI in TA3PCRII-Vektor
mGATA-2:	700bp Fragment des Maus GATA-2 Gens, einkloniert über EcoRI in pBluesscript II KS (+/-)-Vektor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Nardelli)
mGATA-3:	1800bp Fragment des Maus GATA-3 Gens, einkloniert über EcoRI in pGEM 7Zf-Vektor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J.D. Engel, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA)
Pem:	1000bp Fragment Maus Pem c-DNA; einkloniert über EcoRI in pBluescript SK (+/-) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jeanine Kleeman)
Esx1:	1000bp Fragment Maus Esx1 c-DNA, einkloniert über EcoRI in pBluescript II KS (-) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Yuanhao Li, University of Texas, Houston; Texas; USA)

2.1.2 Lösungen

Antikörperlösung (Verdünnung 1:1000) für die whole mount ISH:

Es wurden 2µl Schafserum und 0.2µl Anti-Digoxigenin–Antikörper vermischt und mit PBS auf 200µl aufgefüllt.

Antikörperlösung (Verdünnung 1:2000) für die ISH:

Es wurden für 10 Objektträger 10ml Puffer 2 mit 5µl Anti-Digoxigenin-Antikörper vermischt.

Essigsäureanhydridlösung:

In 150ml DEPC-Wasser wurden 2.26g Triethanolamin eingewogen. Es wurden dann 380µl HCl und 380µl Essigsäureanhydrid (RNase frei) hinzugefügt.

Glutaraldehyd 0.2%:

In 100µl 4% PFA wurden 0.8µl Glutaraldehyd gelöst.

Glycin:

Es wurden 2mg/ml in PBT gelöst.

Hybridisierungsmix:

Es wurden 25ml Formamid mit 12.5ml 20xSSC, 20µl Heparin (100mg/ml) in A. dest, 50µl Tween 20, 250µl Hefe tRNA (10mg/ml) und 500µl Heringssperma DNA vermischt.

Der pH-Wert wurde mit 1M Zitronensäure auf pH 4.5-5.0 eingestellt und der Hybridisierungsmix mit A. dest auf 50ml aufgefüllt.

Ladepuffer für das Agarosegel mit Formaldehyd (Stammlösung):

Für 10 Spuren wurden 10µl 100% Formamid mit 8µl 100% Glycerin, sowie 1µl 2% BPB und 1µl 2% XCFF vermischt.

Lösung II:

14.61g NaCl wurden in 40ml A.dest gelöst. Anschließend wurden 5ml Tris-HCl (10mmol/l, pH7.5) und 500µl Tween20 hinzugefügt und auf 50ml mit A.dest aufgefüllt.

Lösung III:

25ml Formamid wurden mit 2.5ml 20xSSC vermischt und mit A.dest auf 50ml aufgefüllt.

MOPS-Puffer10x:

Es wurden 41.86g Morpholinopropansulfonsäure in 0.8l A. dest gelöst. Nach Zugabe von 4.10g Natriumacetat und 3,70g EDTA wurde der pH-Wert auf pH7.0 eingestellt und mit A. dest auf 1l aufgefüllt.

NTE 2x:

2.42g Tris wurden mit 0.74g EDTA und 58.4g NaCl in 1l DEPC-Wasser gelöst. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf pH 8.0, wurde der Puffer autoklaviert.

Paraformaldehyd (PFA) 4%:

20g PFA wurden in 500ml 1xPBS unter Erhitzen auf 60°C gelöst und mit 1N NaOH geklärt.

PBS 10x:

75.95g NaCl wurden mit 9.94g Na₂HPO₄ und 3.60g NaH₂PO₄ in 1l DEPC-Wasser gelöst.

Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf pH7.4 wurde der Puffer autoklaviert.

PBS/PVP:

0.3g Polyvinylpyrrolidon wurden in 100ml PBS gelöst.

Lösung I:

25ml Formamid, 12.5ml 20xSSC und 50µl Tween20 wurden in 50ml A.dest gelöst.

PBT:

Es wurden 100µl Tween 20 in 100ml 1xPBS gelöst.

Probenpuffer für das Agarosegel mit Formaldehyd:

Für 10 Spuren wurden 28µl steriles A.dest, 50µl 100% Formamid, 17µl Formaldehyd (37%) und 5µl MOPS-Puffer 10x vermischt.

Proteinase K-Lösung 20µg/µl:

Es wurden 300µl Proteinase K (Stammlösung 1mg/ml) mit 150ml Proteinase K-Puffer vermischt.

Proteinase K-Puffer:

12.1g Tris wurden mit 18.6g EDTA in 1l DEPC-Wasser gelöst. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf pH 8.0, wurde der Puffer autoklaviert.

Puffer 1:

12.1g Tris wurden mit 8.76g NaCl in 1l A.dest gelöst. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf pH 7.5, wurde der Puffer autoklaviert.

Puffer 2:

Puffer 1 wurde mit 0.5% blocking agent (Boehringer) gemischt.

Puffer3:

12.1g Tris wurden mit 5.84g NaCl und 10.1g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 1l A. dest gelöst. Der pH-Wert wurde auf pH9.5 eingestellt.

Puffer 4 (TE-Puffer):

1.21g Tris wurden mit 0.37g EDTA in 1l A. dest gelöst. Der pH-Wert wurde auf pH8.0 eingestellt.

RNase A-Lösung für die ISH 20µg/ml:

300µl RNase A (Stammlösung 10mg/ml) wurden mit 150ml 1xNTE-Puffer vermischt.

RNase A-Lösung für whole mount ISH 100µg/ml:

Es wurde 1µl RNase A-Stammlösung (10mg/ml) auf 99µl NTE-Puffer gegeben.

SSC 20x:

175.3g NaCl wurden mit 88.3g in 1l DEPC-Wasser gelöst. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf pH7.2 wurde der Puffer autoklaviert.

Substratlösung für die ISH:

Für ca. 10 Objektträger wurden 35µl BCIP (Stammlösung 50mg/ml in 100% Dimethylformamid (DMF) und 45µl NBT (Stammlösung 25mg/ml in 70% DMF) mit 10ml Puffer vermischt.

Substratlösung für die whole mount ISH:

Es wurden 0.35µl BCIP (Stammlösung 50mg/ml in 100% Dimethylformamid (DMF) und 0.45µl NBT (Stammlösung 25mg/ml in 70% DMF) mit 100µl Puffer vermischt.

TBST 10x:

40g NaCl und 1g KCl wurden in 400ml A.dest gelöst. Anschließend wurden 12.5ml Tris (1mol/l, pH7.5) und 5ml Tween20 hinzugefügt und mit A.dest auf 500ml aufgefüllt.

Ziegsenserum 10%:

Es wurden 10µl mit 90µl PBS vermischt.

2.1.3 Chemikalien und Utensilien

Agarose	Hybaid AGS, Heidelberg
Anti-Digoxigenin-AP FAB Fragment	Roche, Mannheim
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Boehringer blocking Reagenz für DNA labeling and detection kit, nichtradioaktiv	Roche, Mannheim
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid	Sigma, Steinheim
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roth, Heidelberg
Diethylpyrrocarbonat (DEPC)	Sigma, Steinheim
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäureanhydrid	Roth, Heidelberg
EtOH	J.T. Baker, Niederlande
Formamid	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Transfer-Ribonukleinsäure (Hefe tRNA)	Sigma, Steinheim
Heparin	Sigma, Steinheim
Heringssperma DNA	Roche, Mannheim
Histomount	Shandon, Pittsburgh, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
MOPS	Serva, Heidelberg
M2-Medium	Sigma, Steinheim
Natriumacetat (NaAC)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Na ₃ -Citrat	Fluka, Neu-Ulm
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NBT	Roth, Heidelberg
Nylonmembran, positiv geladen	Roche, Mannheim

Paraffin (Paraplast)	Sherwood Medical Co., St. Louis, USA
Rotationsmikrotom	Reichert-Jung
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Heidelberg
PVP	Merck, Darmstadt
Polymerase SP6	Roche, Mannheim
Polymerase T3	Roche, Mannheim
Polymerase T7	Roche, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Ribonuklease A	Roth, Heidelberg
RNAasin	Promega, Mannheim
Schafserum	Sigma, Steinheim
Super-Frost Objektträger	Menzel-Gläser, Deutschland
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Steinheim
UTP-Gemisch (DIG-RNA-labeling Mix)	Roche, Mannheim
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Sigma, Steinheim

2.2 Versuchstiere und Gewebegewinnung

Für die Versuche wurden Blastozysten und Implantationskammern verschiedener Stadien benötigt, diese wurden Mäusen vom Stamm C57BL/6Z entnommen.

Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen, nach dem Standard des zentralen Tierlabors des Uniklinikums Essen, gehalten.

Für die Blastozystengewinnung und für die Gewinnung der Implantationskammern wurden über Nacht, jeweils zur Verpaarung, zwei geschlechtsreife Weibchen zu einem zeugungsfähigen Männchen gesetzt. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen Vaginalpfropf hin überprüft. Der Tag des Vaginalpfropfes wurde als 0.5 dies post coitum definiert.

Am Tag 3.5pc wurden die Tiere per zervikaler Dislokation zwischen 10 und 12 Uhr zwecks Blastozystengewinnung getötet.

Die Blastozysten wurden mit M2-Medium aus den zuvor präparierten Uteri ausgespült, danach 5 mal in PBS/PVP gewaschen und anschließend über Nacht in 4% Paraformaldehyd

mit pH 7.2 bei 4°C fixiert, um sie dann am folgenden Tag für die „whole mount in situ Hybridisierung“ zu verwenden.

Für die Gewinnung der Implantationskammern der Stadien 5.5dpc, 6.5dpc, 7.5dpc, 8.5dpc, 9.5dpc und 10.5dpc wurden die Tiere auf die gleiche Weise wie oben beschrieben verpaart. Die Uteri wurden an den entsprechenden Tagen freipräpariert, entnommen und ebenfalls über Nacht in 4%PFA bei 4°C fixiert. Anschließend wurden sie nach der Standardmethode in Paraffin eingebettet.

Die Gewebeschnitte für die in situ Hybridisierung wurden mit einem Rotationsmikrotom auf die Dicke von 5 bis 7µm geschnitten und auf Super-Frost Plus Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3 Vorbereitungen für die Herstellung einer Cx43-mRNA-Sonde

Zur Überprüfung der ISH auf ihre Ergebnisse wurde eine Cx43-Sonde hergestellt, die an Paraffinschnitten von Implantationskammern getestet wurde. Da das Expressionsmuster von Cx43 bekannt ist, diente diese Sonde dazu, um die Etablierung der ISH sicherzustellen. Zunächst war dazu eine PCR mit anschließender Klonierung notwendig, um eine Sonde für die später folgende in vitro Transkription zu erhalten.

2.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) von Cx43 und anschließende Klonierung

Aus einer Schwanzbiopsie wurde die genomische DNA der Maus isoliert. Mit Hilfe der Cx43-Sequenz aus dem Datenbankeintrag X06656 bzw. M19317 (Genbank) wurden die Primer nach Standardkriterien ausgewählt.

Der 5'-Primer 5'-cgtgaggaaagtaccaaacagcagcagact-3' entspricht dabei der Position 45-74 des Datenbankeintrags X06656 der Datenbank M19317, der 3'-Primer

5'-ttctgtcaccagtaaccagctgtaccag-3' entspricht der Position 1052-1082 des Eintrags X06656 der Datenbank M19317. Zur Amplifikation des ausgewählten Cx43-Genabschnitts wurde folgender PCR-Reaktionsansatz verwendet:

0.7µl genomische DNA (entspricht ca. 3.5 µg DNA)
 0.5µl dNTPs (100mM)
 2.5µl Reaktionspuffer (mit MgCl₂)
 1.3µl Primer Cx43 up (38.5pmol/µl)
 0.5µl Primer Cx43 down (25pmol/µl)
 0.7µl Taq-Polymerase (1U/µl)
 Ad 25µl H₂O

Die Durchführung der PCR erfolgte wie unten stehend in einem Gerät der Firma Biometra.

Anzahl	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1x	94	2
33 x	94	2
	62	1.5
	72	2
1 x	72	10

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Elektrophorese auf einem 0.8-prozentigen Agarosegel überprüft und anschließend per Fotografie dokumentiert.

2.3.2 Gelextraktion des PCR-Produkts von Cx43

Die Extraktion des PCR-Produkts aus dem Agarosegel erfolgte nach dem Qiaquick Gel Extraction Kit Protokoll (Qiagen), den dazugehörigen Puffern und Aufreinigungssäulen. Dazu wurden zunächst nach vorangegangener Elektrophorese die DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen.

Anschließend fügte man zu einem Volumen Gel 3 Volumina Puffer QX1 hinzu und inkubierte dieses dann bei 50°C für 10min, so dass sich das Gel im Puffer auflöste.

Jetzt fügte man Isopropanol in der Gelvolumenmenge hinzu und vermischte alles und gab es auf eine Aufreinigungssäule. Das Gemisch in der Säule wurde dann für 1min zentrifugiert und das „flow through“ verworfen. Es folgte ein Waschvorgang mit PE-Puffer und Ethanol. Das flow through nach der anschließenden Zentrifugation für 1min wurde ebenfalls wieder verworfen.

Die Eluierung der DNA aus der Aufreinigungssäule erfolgte mit 10mM Tris-HCl und einer 1minütigen Zentrifugation. Anschließend wurde das Eluat auf Eis gelegt und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

2.3.3 Ligation des PCR-Produkts von Cx43 in pCRII und anschließende Transformation

Für die Ligation des PCR-Produkts von Cx43 wurde das TA-Cloning Kit mit dem Dual Promotor pCRII von Invitrogen verwendet. Nach der beiliegenden Formel

$$\text{Xng PCR-Produkt} = \frac{(\text{Y bp PCR-Produkt}) \times (50\text{ng pCRII Vektor})}{(\text{Größe in bp des pCRII Vektors} \sim 3900)}$$

wurde die benötigte Konzentration des PCR-Produkts errechnet und nach folgendem Protokoll wurde die Ligation in einem 10µl Ansatz angesetzt.

1µl	PCR-Produkt Cx43 (10ng/µl)
1µl	10x Ligationspuffer
2µl	pCRII Vektor (25ng/µl)
5µl	steriles H ₂ O
1µl	T4 DNA Ligase (4.0 Weiss Units)

Dann wurde der Ligationsansatz bei 14°C für mindestens 4h inkubiert und anschließend der Transformation zugeführt, die ebenfalls nach dem Protokoll der Firma Invitrogen durchgeführt wurde. Es wurden dazu die mitgelieferten kompetenten Zellen (INVαF⁺) verwendet, die dann auf LB-Mediumaggar angezüchtet wurden. Einige der gewachsenen Bakterienkolonien wurden dann mit einem sterilen Zahnstocher vom Aggar abgenommen und über Nacht in 3ml LB-Medium mit Ampicillin (1µl/ml) im Rundschüttler inkubiert. Daran an schloss sich eine Minipräparation mit anschließendem analytischen Restriktionsverdau, um den Erfolg der Klonierung und Ligation zu überprüfen.

Zur Minipräparation wurde das LB-Medium mit den enthaltenen Bakterienkolonien 1.5ml Reaktionsgefäße umgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100µl GTE (2.1.2), einem Chelatbildner, der Ionen aus der Bakterienmembran entfernt, gelöst. Anschließend wurde das ganze bei 37°C für 2min und anschließend für 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden für die Lösung von Fetten, 200µl NaOH/SDS hinzugefügt und mit der Hand wurde das Gemisch für 2-3sec geschüttelt. Anschließend wurde das 1.5ml Reaktionsgefäß für 5min auf Eis gestellt. Zur Neutralisierung des Gemisches wurden 150µl NaAC hinzugefügt und wieder per Hand für 2-3sec geschüttelt und auf Eis für 5min gekühlt. Es folgte eine 12minütige Zentrifugation, nach der der Überstand in ein frisches 1.5ml Reaktionsgefäß umpipettiert wurde. Es wurden 700µl EtOH absolut (-20°C) hinzugefügt und anschließend für 20min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Das Pellet wurde dann getrocknet und

anschließend in 50µl TE-Puffer resuspendiert. 2µl wurden in einem Restriktionsverdau verwendet. Ergab dieser das erwünschte Ergebnis einer erfolgreichen Klonierung und Ligation, so wurden Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Aggarplatte genommen und in 100ml LB-Medium mit Ampicillin (1µl/ml) im Rundschüttler bei 37°C geschüttelt.

Anschließend wurde eine Maxipräparation mit dem Qiagen Plasmid Purification Kit durchgeführt.

2.4 Herstellung der mRNA-Sonden für die in situ Hybridisierung

Die mRNA- Sonden für die in situ Hybridisierung wurden mittels in vitro Transkription hergestellt.

Die DNA der jeweiligen Transkriptionsfaktoren GATA-2, GATA-3, Pem und Esx1 der Maus sowie die DNA von Cx43 waren in Vektoren einkloniert, die jeweils am Ende der multiplen cloning site einen Promotor für eine RNA-Polymerase (T3, T7, SP6) besaßen. Diese mussten zunächst linearisiert werden, um einen gezielten Abbruch der Transkription zu ermöglichen, so erhielt man eine mRNA-Sonde in gewünschter Länge und Basensequenz.

Dazu wurde ein Restriktionsverdau mit jeweils einem Restriktionsenzym, das möglichst am Ende des in die „multiple cloning site“ einklonierten Transkriptionsfaktors schnitt, angesetzt (siehe Tabelle 1).

Die Restriktionsansätze wurden wie folgt angesetzt:

In einem 20µl Ansatz wurde jeweils ca. 5µg Plasmid-DNA mit 6Units Restriktionsenzym, dem entsprechenden Puffer und sterilem A. dest gemischt und für mindestens 1.5h bei 37°C inkubiert.

m-RNA-Sonde und Vektor	Restriktionsenzyme zur Linearisierung; Antisense (3'-5'Richtung)	Restriktionsenzyme zur Linearisierung; Sense (5'-3'Richtung)
GATA-2 in Blueskript KS	BamHI	HindIII
GATA-3 in pGEM 7Zf	XbaI	BstXI
Pem in Bluescript SK	Ecl136	HindIII
Esx1 in Bluescript KS	BamHI	HindIII
Cx43 in TA3PCRII	NotI	HindIII

Tabelle 1: Verwendete Restriktionsenzyme zur Linearisierung der Vektoren für die in vitro Transkription der Antisense- bzw. sense-mRNA-Transkripte

Die Linearisierung wurde per Elektrophorese verifiziert. War die Restriktion vollständig, wurde der Ansatz einer Phenol-Chloroform- Behandlung unterzogen und anschließend über Nacht bei -80°C mit 3M Natriumacetat und zweifachem Volumen von absolutem Ethanol gefällt.

Nach der Fällung erfolgte nun die eigentliche in vitro Transkription.

Hierzu wurden ca. $2\mu\text{g}$ der linearisierten Plasmid-DNA verwendet.

In einem $20\mu\text{l}$ -Ansatz wurden das Template, DEPC-Wasser, der Dig-RNA-labeling-Mix mit entsprechendem Puffer, DTT, die entsprechende Polymerase (siehe Tabelle 2) und zum Schutz des Transkripts gegen RNA-Abbau durch RNAsen RNasin unter einer Sterilbank miteinander vermischt und anschließend bei 37°C für 2h inkubiert.

RNA-Sonden	Polymerasen für die antisense-Sonde	Polymerase für die sense-Sonde
GATA-2	T3	T7
GATA-3	Sp6	T7
PEM	T3	T7
ESX1	T7	T3
Cx43	Sp6	T7

Tabelle 2: verwendete Polymerasen zur Herstellung von mRNA-Sonden mit der „In vitro Transkription“

2.5 Northern blot zur Überprüfung der Sonden

Hier wurde sichergestellt, dass die in vitro Transkription der Templates erfolgreich war und man ein „antisense“ und „sense“-Transkript der gewünschten Länge erhalten hatte.

2.5.1 Agarosegel-Elektrophorese mit Formaldehyd

Um die RNA elektrophoretisch aufzutrennen wurden Formaldehyd-haltige Agarosegele angewendet. Diese verhindern durch denaturierende Vorgänge RNA-Trennartefakte, die durch Doppelstrangbildung entstehen können.

Für das Gel wurden 26ml 1.7prozentige Agarose (Hybaid AGS), 4ml 10facher MOPS-Puffer und 7.5ml Formaldehyd (37%) unter leichtem Schwenken miteinander vermischt. Das Gel wurde unter dem Abzug gegossen und in eine Elektrophorese-Apparatur, gefüllt mit einfachem MOPS-Puffer eingebracht.

Für die Proben wurden ca. $5\mu\text{g}$ RNA der entsprechenden Sonden mit $10\mu\text{l}$ Probenpuffer gemischt und anschließend abzentrifugiert. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei

65°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Kurz vor dem Auftragen der Probe auf das Gel, wurden noch 2µl Ladepuffer hinzugefügt. Das Gel wurde mit einer Spannung von 80 Volt gefahren.

2.5.2 Northern Blot (RNA-Transfer)

Für den Transfer der RNA aus dem formaldehydhaltigen Agarosegel auf eine Nylonmembran (Roche) wurde ein Kapillarblot angewendet. Hierzu wurde das Gel nach der elektrophoretischen Auftrennung für 10min in A.dest und für 30min in 10x SSC gewaschen. Auf eine NaOH und Tris/HCl-Behandlung wurde zwischen den beiden oben erwähnten Waschgängen verzichtet, da die RNA-Fragmente nicht sehr groß und somit gut transferierbar waren.

Als Transferlösung wurde 20x SSC verwendet. Nach mindestens zwölfstündigem Blotten wurde der Vorgang abgebrochen und die transferierten mRNA-Banden, durch dreiminütiges Auflegen der Nylonmembran auf einen UV-Tisch, fixiert. Anschließend erfolgten 3 Waschgänge des Blots in einfachem PBS-Puffer jeweils für 5 min. Das Anfärben der Banden geschah wie folgt und alle Waschschrte wurden unter leichtem Schwenken auf einem Schütteltisch durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Blockierung des Blots mit zweiprozentigem Schafserum, um unspezifische Bindungen des anti-Digoxigenin-Antikörpers, der anschließend hinzugefügt wurde, zu verhindern. Der Antikörper wurde vor der Zugabe mit Blocklösung aus Schafsserum auf eine Konzentration von 1:10000 verdünnt. Die Inkubation des Blots erfolgte dann für eine halbe Stunde.

Die Antikörperbindung an die mit Digoxigenin-markierte mRNA wurde durch dreimaliges zehnminütiges Waschen erneut unter leichtem Schwenken in einfachem PBS-Puffer abgebrochen. Zur Vorbereitung des Anfärbens der Banden wurde der Blot für 5min in Puffer 3 (2.1.2) gewaschen.

Es folgte im Dunkeln die Färbung mit den lichtempfindlichen Substraten BCIP (Roth) und NBT (Roth). Die Reaktion wurde nach regelmäßiger Kontrolle nach genügender Anfärbung der Banden durch Waschen in einfachem PBS abgebrochen.

2.6 Nichtradioaktive in situ Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung (im Folgenden als ISH bezeichnet) wurde an Paraffinschnitten der Implantationskammern der Stadien 5.5dpc bis einschließlich 10.5dpc durchgeführt.

2.6.1 Entparaffinisieren

Für die nichtradioaktive ISH wurden die bei -20°C gelagerten Paraffinschnitte aufgetaut und nach dem Trocknen 2mal für 10 Minuten in Xylol getaucht. Dann folgte eine absteigende Ethanolreihe mit den Konzentrationen 100, 100, 96, 85, 70, 50, 30% in denen die Schnitte jeweils 2 Minuten gewaschen wurden. Die Verdünnung des Ethanols erfolgte mit 0.85 prozentiger NaCl-Lösung. Anschließend wurden die Paraffinschnitte je 5 Minuten zunächst in 0.85% NaCl und dann in PBS gewaschen.

2.6.2 In situ Hybridisierung

Zu Beginn erfolgte eine dreißigminütige Fixierung der entparaffinierten Gewebeschnitte in 4% PFA pH 7.2.

Zur Dekontamination von RNAsen wurden sie dann 2 Mal für 15 Minuten in PBS mit 0.1% aktivem DEPC gewaschen.

Um das Gewebe für die RNA-Sonde durchgängiger zu machen folgte eine Behandlung mit Proteinase K mit einer Konzentration von $20\mu\text{g/ml}$ für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad.

Anschließend erfolgte ein erneutes Waschen mit PBS und dreißigminütiger Fixierung mit 4% PFA, welches danach mit DEPC-Wasser abgespült wurde.

Zur Verminderung des Hintergrundsignals erfolgte eine zehnminütige Inkubation in Essigsäureanhydrid (2.1.2).

Dann wurden die Schnitte 2 Mal 15 Minuten in PBS gewaschen und danach in 5x SSC equilibriert.

Zur Vorhybridisierung kamen die Präparate in eine feuchte Kammer, wobei sie mit einem Vorhybridisierungsmix aus 5xSSC und 50% Formamid und Heringssperma – DNA ($40\mu\text{g/ml}$) (2.1.2) überschichtet und mit einem Streifen Parafilm abgedeckt wurden.

Die Vorhybridisierung wurde für 2 Stunden bei 58°C im Wasserbad durchgeführt. Sie diente der Verminderung von Hintergrundsignalen durch Vermeidung unspezifischer Bindungen.

Für die Hybridisierung wurden 30-50 $\mu\text{g/ml}$ der Sonden 5 Minuten zusammen mit jeweils 5 μl Heringssperma-DNA und 5 μl t-RNA aufgekocht, anschließend mit 300 μl Hybridisierungsmix (2.1.2) vermischt und, nach Abtropfen des Vorhybridisierungsmix, auf den Objektträger aufgetragen. Erneut wurde mit Parafilm abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 58°C im Wasserbad.

Am nächsten Tag wurden die Präparate bei 58°C in 5xSSC für 15 Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie bei 65°C eine Stunde in 2xSSC belassen. Dann folgte ein zehnminütiger Waschvorgang bei ebenfalls 65°C in 0.2xSSC.

Es schloss sich eine Equilibrierung mit Puffer 1 (2.1.2) für 5 Minuten an.

Nach der Equilibrierung wurde der Anti-Digoxigenin-Antikörper, an den ein alkalisches Phosphatase Konjugat gebunden ist, (Verdünnung 1:2000) aufgetragen und der Objektträger wiederum mit Parafilm abgedeckt. Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am dritten Tag wurde der Antikörper 2x 15 Minuten mit Puffer 1 (2.1.2) abgewaschen. Nun erfolgte die Equilibrierung mit Puffer 3 (2.1.2) und die Inkubation mit dem Substrat NBT/BCIP in Puffer 3 (2.1.2). Die Schnitte wurden zur Farbentwicklung in einer feuchten Kammer dunkel gelagert; die Färbung wurde zwischenzeitlich immer wieder unter dem Mikroskop (2.1.2) kontrolliert und zum gegebenen Zeitpunkt durch fünfzehnminütiges Waschen in TE-Puffer abgebrochen.

Das Eindecken der Präparate erfolgte mit Histomount und die Dokumentation der Ergebnisse per Axiophot (Zeiss) mit einer digitalen Kamera (Zeiss).

2.6.3 Whole mount in situ Hybridisierung

In Anlehnung an eine Vorschrift von Rosen und Beddington (1993) erfolgte die Untersuchung, der Blastozysten der Maus, auf das Vorkommen und die Verteilung der mRNA der Transkriptionsfaktoren GATA-2, GATA-3, PEM, ESX1 und Twist.

Die im Folgenden beschriebenen Waschvorgänge wurden in Petrischalen (Falcon) durchgeführt, für die Inkubationen der Blastozysten im Wasserbad wurden die Petrischalen in Küvetten untergebracht.

Die über Nacht fixierten Blastozysten wurden dreimal in PBT gewaschen. Um das Gewebe für die Sonde durchgängiger zu machen, folgte eine fünfminütige Inkubation mit Proteinase K (20µg/ml) bei 37°C im Wasserbad.

Der Verdau mit Proteinase K wurde mit Glycin in PBT (2mg/ml) gestoppt und die Blastozysten wurden dann in 4% PFA in PBS pH 7.2 mit 0.2% Glutaraldehyd erneut fixiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen in PBT jeweils für 5 min und dann die Vorhybridisierung für 1h bei 70°C mit dem Hybridisierungsmix (2.1.2). Die Sonden wurden für die nachfolgende Hybridisierung bei 70°C über Nacht ebenso, wie in Abschnitt 2.5.2. schon beschrieben, vorbereitet.

Auf die Hybridisierung folgten zwei dreißigminütige Waschvorgänge in Lösung I (2.1.2) bei 70°C und ein zehnminütiger bei ebenfalls 70°C in einer 1:1 Mischung bestehend aus Lösung I und II (2.1.2).

Danach wurden die Blastozysten dreimal 5min bei Raumtemperatur in Lösung II (2.1.2) gewaschen.

Um nicht gebundene RNA-Sonde zu entfernen, folgte ein Verdau mit RNase A (100µg/ml) bei 37°C für eine halbe Stunde. Anschließend wurde mit Lösung III (2.1.2) bei 65°C dreimal gewaschen.

Für die nachfolgende Antikörperinkubation bei 4°C über Nacht erfolgte eine Umpufferung mit TBST.

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurde zunächst für 1h in einfach konzentrierter Blockierlösung in TBST inkubiert. Dann folgte die Inkubation mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper, der ein Alkalische Phosphatase Konjugat trägt, (Verdünnung 1:2000) in TBST bei 4°C über Nacht.

Der nicht gebundene Antikörper wurde durch sechsmaliges Waschen, jeweils für 30min, entfernt.

Es folgte eine Umpufferung in Puffer 3 (2.1.2) und anschließend die Inkubation mit dem Substrat NBT (25mg/ml)/BCIP (50mg/ml).

Die Färbung wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert und schließlich mit TE-Puffer beendet.

Nach 15min wurden die Blastozysten aus dem TE-Puffer entnommen und in Glycerin gelagert.

Zur Dokumentation wurden sie unter dem Mikroskop (Axiophot, Kamera Zeiss) fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1. Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren während der Prä- und Postimplantationsphase der Maus

In der Blastozyste sind die beiden Derivate Trophektoderm und Embryo bereits auf die Expression von Connexinen und einiger Transkriptionsfaktoren untersucht worden.

Die Frage ergab sich, ob derzeit, hier die für die Plazentaentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktoren ebenfalls eine Kompartimentisierung aufweisen.

Deswegen wurden im folgenden Blastozysten der Maus mittels whole mount ISH auf die Expression der mRNA der jeweiligen Transkriptionsfaktoren untersucht. Da bei den Connexinen erst nach der Implantation diese Kompartimentisierung erfolgt, wurden zusätzlich die Stadien 5.5 dpc bis 10.5 dpc mit der nicht radioaktiven ISH auf die mRNA der Transkriptionsfaktoren untersucht.

3.1.1 Expression des Transkriptionsfaktors GATA-2

Die mRNA des Transkriptionsfaktors GATA-2 wurde an Tag 3.5pc mittels der whole mount in situ Hybridisierung in der Blastozyste, sowohl in der ICM als auch im Trophektoderm (TE), detektiert. Es war dabei kein sichtbarer Unterschied in der Quantität der mRNA zwischen der ICM und dem Trophektoderm auszumachen. Die Expression schien allerdings im Vergleich zu den anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren relativ schwach, aber gegenüber der Kontrolle deutlich abgrenzbar (siehe Abb. 4).

An Tag 5.5pc beginnen sich aus dem Trophektoderm der EPC und aus der ICM das embryonale Ektoderm (EE) zu entwickeln.

In diesem Stadium zeigte sich eine Expression von GATA-2 sowohl in den Derivaten des Trophektoderm, als auch in denen der ICM.

Dies bedeutet somit eine deutliche Expression innerhalb des extraembryonalen Ektoderms (EXE), den GC und ebenso im EPC. Auch in den palisadenförmig angeordneten Zellen des embryonalen Ektoderm und auch in den Zellen des parietalen und viszerale Endoderms, bei denen es sich wie beim embryonalen Ektoderm um Derivate der ICM handelt, ließ sich ein deutliches Signal erkennen. Zusätzlich zu den Signalen in den sich entwickelnden embryonalen und extraembryonalen Geweben wies die maternale Dezidua ebenfalls eine starke mRNA-Expression auf.

Ab Tag 6.5pc war die Expression im embryonalen Ektoderm, bis auf ein sehr schwaches Signal in einzelnen Zellen, nicht mehr nachweisbar. GATA-2 war vom Tag 8.5pc bis zum

Stadium 10.5dpc im embryonalen Gewebe zu detektieren. In den Derivaten des Trophektoderms (EPC und extraembryonales Ektoderm) war auch an Tag 6.5pc und 7.5pc (siehe Abb. 5) die GATA-2-Expression in gleicher Stärke wie an Tag 5.5pc zu beobachten. Die Expression in den GC und dem viszeralem Endoderm (VE) hatte dagegen an Expression verloren. Das mRNA-Signal im viszeralem Endoderm beschränkte sich auf wenige Zellen, die sich am embryonalen Ektoderm befanden. Zusätzlich zeigte sich zu der Expression in den GC, eine Expression im extraembryonalen Mesoderm (EXM).

Dieses entwickelt sich aus der ICM-Zelllinie und beteiligt sich während der weiteren Entwicklung an der Entstehung des Amnions und zusammen mit dem viszeralem Endoderm an der Ausbildung des Dottersacks.

An Tag 8.5pc (siehe Abb. 5) entwickelt sich die Chorionplatte, die sich aus einem mesodermalen und einem ektodermalen Derivat zusammensetzt. Hier fand sich sowohl im parietalen (ektodermalen) Anteil, sowie im viszeralem (mesodermalen) Anteil der Chorionplatte GATA-2 mRNA, wobei der parietale Anteil eine stärkere Expression aufwies. Der viszerale Dottersack zeigte ebenfalls ein mRNA-Signal. Hier war allerdings die mesodermale Komponente deutlicher angefärbt als die ektodermale.

In diesem Stadium der Entwicklung trat erneut ein mRNA-Signal im embryonalen Gewebe auf. Diese Expression, die in allen drei Keimblättern (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) vertreten war, hielt bis zum letzten untersuchten Stadium 10.5dpc an.

Am Tag 9.5pc und 10.5pc (siehe Abb. 5) fusioniert die Allantois mit der Chorionplatte, von der die chorioallantoide Plazenta gebildet wird. Diese übernimmt die Ernährungsfunktion für den Embryo, die bisher vom Dottersack geleistet wurde. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine Expression in allen drei Schichten der Plazenta. Sowohl in den GC, als auch im Spongiotrophoblasten und der Labyrinthenschicht ließ sich ein deutliches Signal nachweisen. Das Signal war im Zytoplasma lokalisiert, eine Expression im Kern war nicht nachweisbar. Die eindeutig zu identifizierende Expression im viszeralem Dottersack an Tag 9.5pc ließ sich an Tag 10.5pc nicht mehr detektieren.

Die Kontrollen („senses“), die für jedes untersuchte Stadium durchgeführt wurden, zeigten in keinem Fall ein Signal.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass der Transkriptionsfaktor GATA-2 sowohl in den Derivaten der ICM als auch in denen des Trophektoderms exprimiert wurde. Zunächst erfolgte eine transiente Reduktion der Expression im embryonalen Ektoderm an Tag 6.5pc und damit eine Restriktion der Expression auf das extraembryonale Gewebe. Jedoch war eine Reexpression im embryonalen Gewebe ab Tag 8.5pc zu verzeichnen.

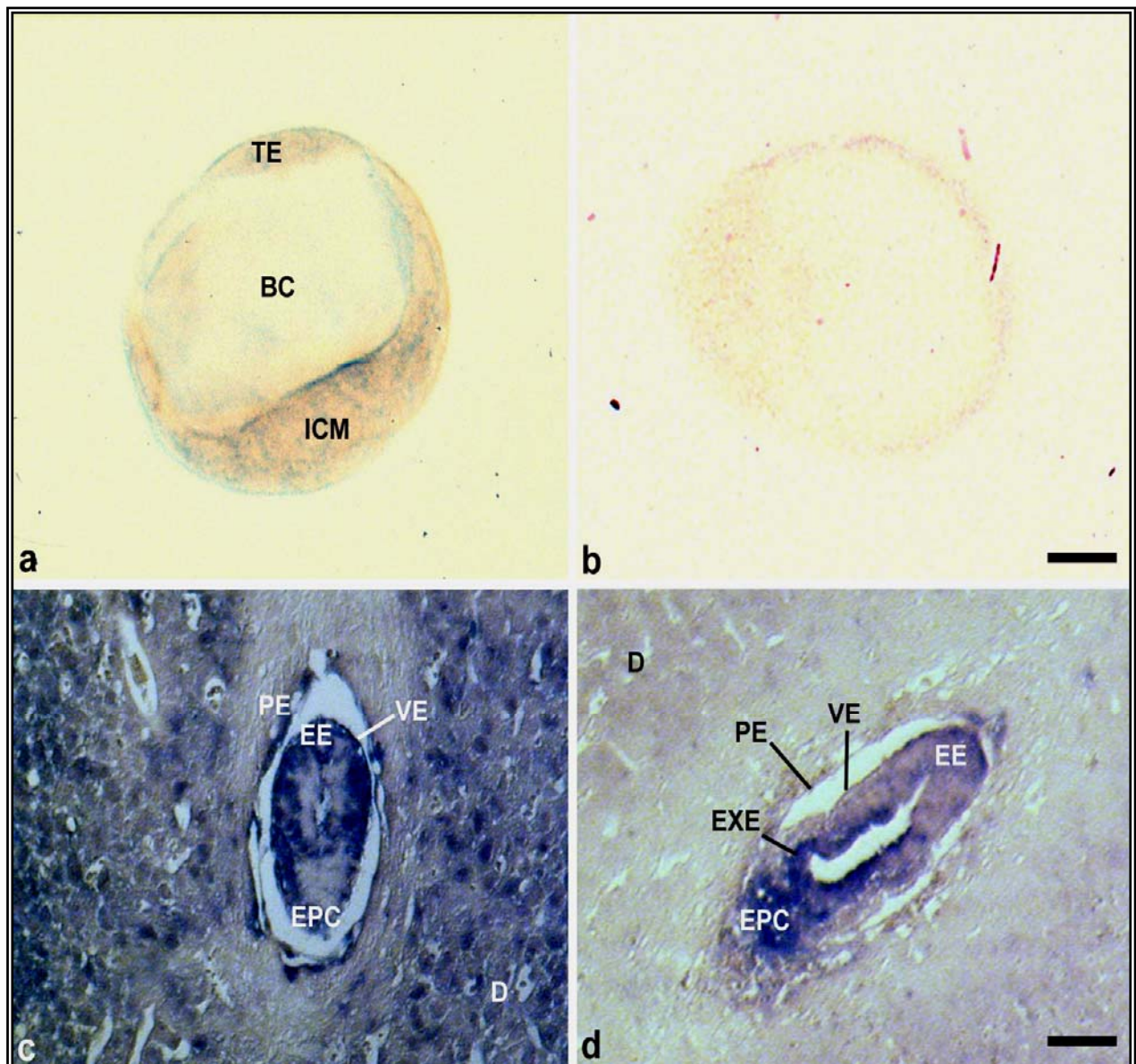


Abb. 4 a-d: a und b: In situ Hybridisierung von GATA-2 während der Präimplantationsphase an Blastozysten im Stadium 3.5pc. GATA-2 zeigt schwache Signale im Bereich der inneren Zellmasse (ICM), sowie im Bereich des Trophektoderms (TE) (a). Die Kontrolle (b) weist keine Anreicherung von GATA-2-mRNA auf. Es ist lediglich ein schwaches Hintergrundsignal zu erkennen.

c und d: In situ Hybridisierung während der Postimplantationsphase an Paraffinschnitten.

Im Stadium 5.5pc (c) zeigen sich eine Expression im Bereich des Ektoplazentarkonus (EPC), des embryonalen Ektoderms (EE), des viszeralen Endoderms (VE) und des parietalen Endoderms (PE) sowie der Dezidua (D).

An Tag 6.5pc (d) konzentriert sich die Expression auf die extraembryonalen Gewebe, wie der Ektoplazentarkonus (EPC), dem extraembryonalen Ektoderm. Das parietale Endoderm zeigt keine Expression mehr, das viszerale zeigt eine noch schwache Expression in einigen Bereichen. (Balken für a und b = 15µm, Balken für c und d = 55 µm)

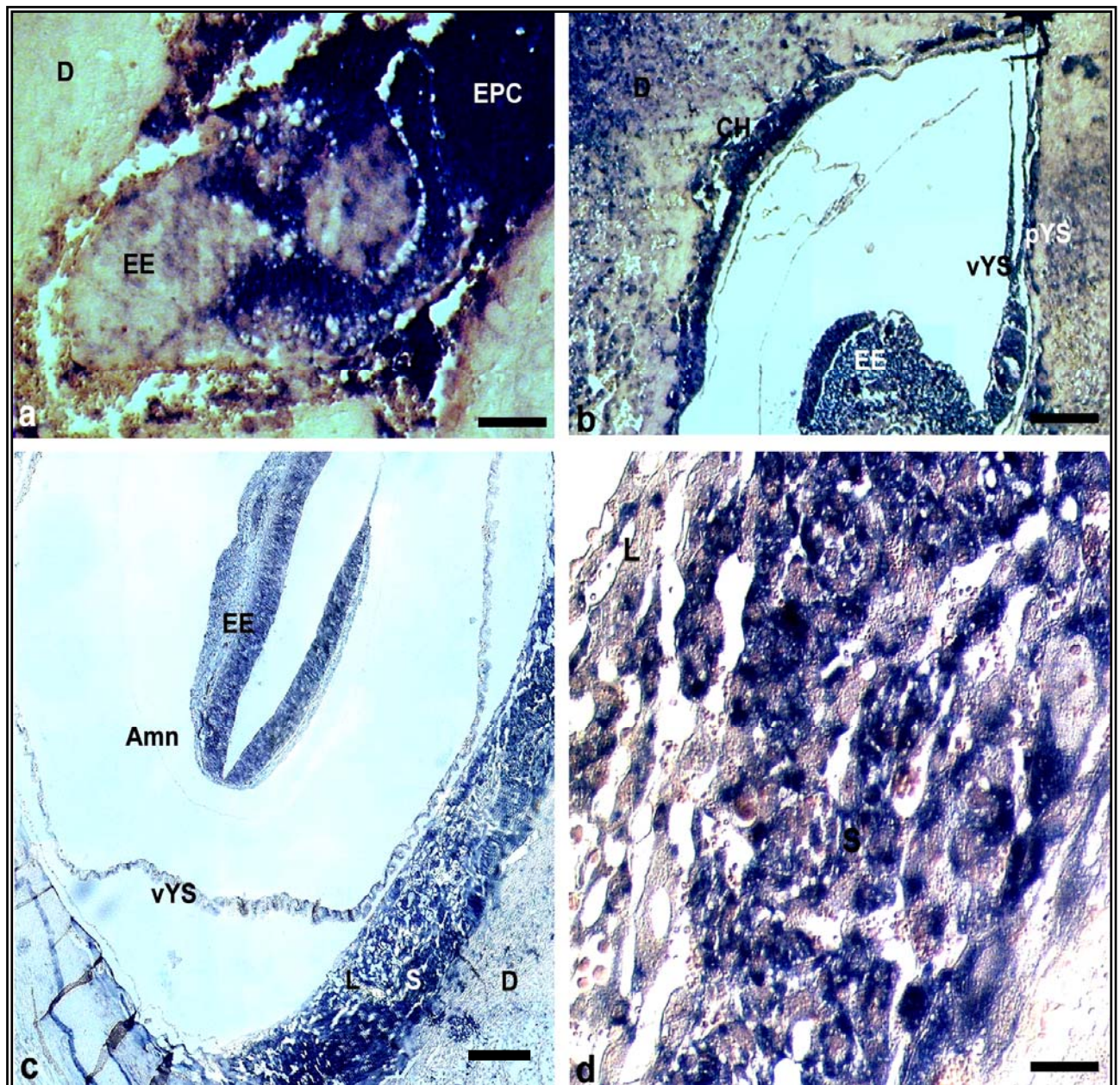


Abb. 5 a-d: In situ Hybridisierung von GATA-2 während der Postimplantationsphase an Paraffinschnitten. Im Stadium 7.5pc (a) lässt sich ein deutliches Signal in den extraembryonalen Geweben erkennen. Im embryonalen Ektoderm (EE) lässt sich weiterhin kein Signal verzeichnen, jedoch im viszeralem und parietalem Endoderm (VE, PE), die ebenfalls Derivate der inneren Zellmasse sind. An Tag 8.5 (b) und 10.5pc (c) zeigt sich wiederum eine Anfärbung des embryonalen Ektoderms. Auch die chorioallantoide Plazenta (b) und im weiteren Verlauf das Labyrinth und der Spongiotrophoblast (c und d) der Plazenta weisen ein deutliches Signal im Bereich des Zytoplasmas auf. Ebenso zeigt der Dottersack (vYS und pYS) an Tag 8.5pc und 10.5pc eine deutliche Expression der GATA-2-mRNA. (Balken a = 55 μ m, Balken b = 100 μ m, Balken c = 150 μ m, Balken d = 12.5 μ m).

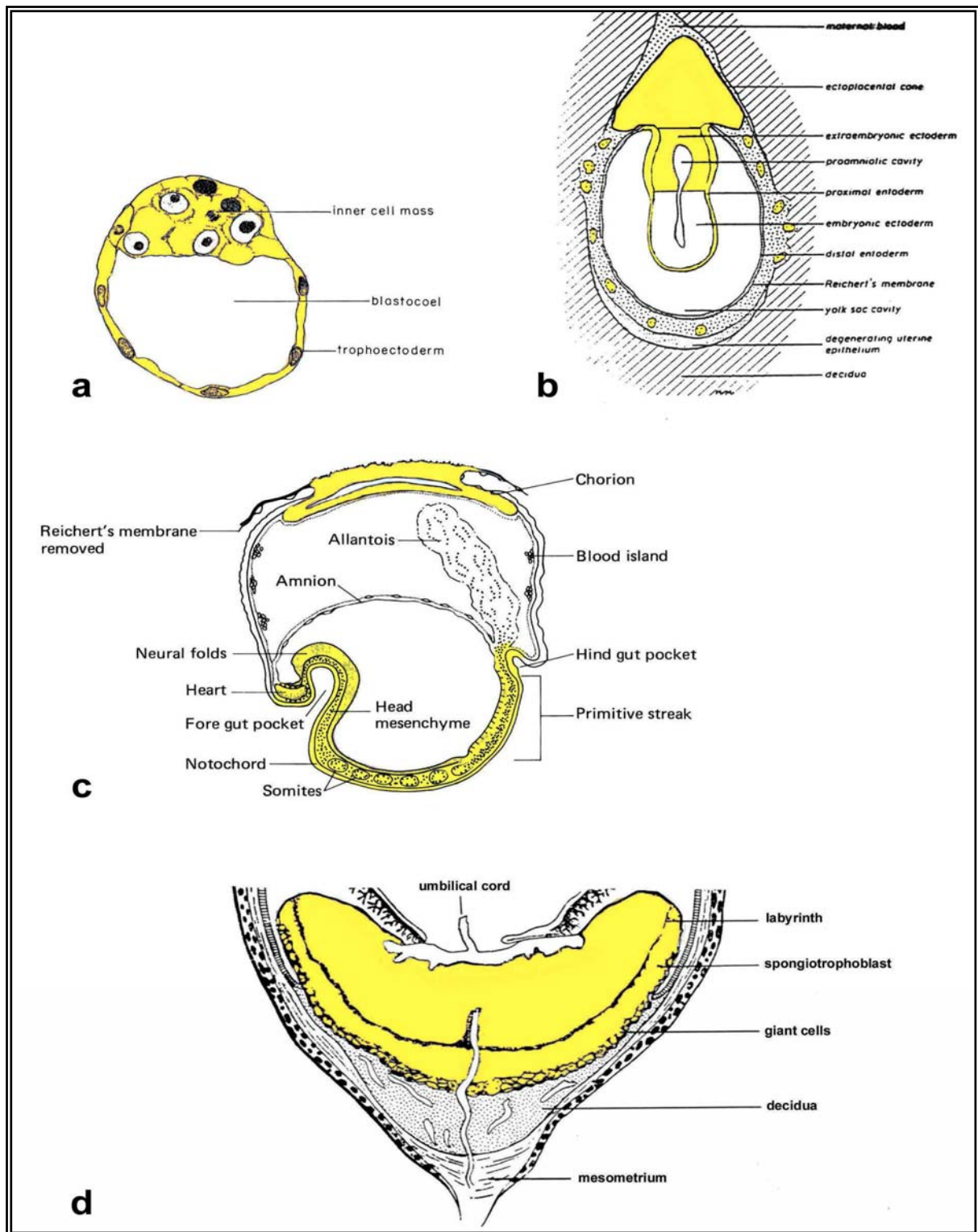


Abb.6: a-d: Expression des Transkriptionsfaktors GATA-2 während der Prä- und Postimplantationsphase.

- (a) 3.5dpz Blastozyste. Expression in der inneren Zellmasse und dem Trophektoderm.
 - (b) 6.5dpz Eizylinderstadium, Bildung der primären Trophoblastriesenzellen und Vorhandensein des Ektoplazentarkonus.
 - (c) 8.5dpz Bevorstehende Bildung der chorioallantoiden Plazenta durch Verschmelzung von Allantois und Chorionplatte.
 - (d) 10.5dpz Plazenta bestehend aus Labyrinth, Spongiotrophoblast und Trophoblastriesenzellen
- (a, c und d nach Rugh, 1990, b nach Müntener und Hsu, 1977)

3.1.2 Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3

Der weitere Zinkfingertranskriptionsfaktor GATA-3 zeigte wie GATA-2 während der Präimplantationsphase an Tag 3.5pc sowohl eine Expression in der ICM, als auch im Trophektoderm (siehe Abb. 7) ohne Unterschied in der Expressionsstärke. Nach der Implantation war GATA-3 mRNA vornehmlich in den Derivaten des Trophektoderm, (EPC, dem extraembryonalen Ektoderm und den GC) nachweisbar. Es ließ sich ebenfalls ein Signal im embryonalen Ektoderm ausmachen, wobei es sich allerdings bei der näheren Betrachtung auch um ein Artefakt handeln konnte (siehe Abb. 7).

Am Tag 7.5pc war eine Kompartimentisierung der Expression zwischen den extraembryonalen und den embryonalen Geweben (siehe Abb. 7 und 8) zu erkennen. Die Untersuchungen zeigten eine Expression im EPC, dem extraembryonalen Ektoderm und den GC, sowie im viszeralen und parietalen Endoderm. Im embryonalen Gewebe, als auch im extraembryonalen Mesoderm und der Allantois ließ sich keine Expression nachweisen. An Tag 8.5pc (siehe Abb. 8) zeigte die in situ Hybridisierung ein Signal in der Chorionplatte, wobei der parietale Anteil stärker als der viszerale markiert war. Die primären GC um die Implantationskammer waren ebenfalls markiert.

An den Tagen 9.5pc und 10.5pc (siehe Abb. 8), nachdem sich die chorioallantoide Plazenta differenziert hat, zeigten die Signale in diesen beiden Stadien ein ähnliches Expressionsmuster. Die Plazenta zeigte in beiden untersuchten Stadien in allen drei Schichten, GC, Spongiotrophoblast und dem Labyrinth, eine starke Expression von GATA-3. Der Dottersack zeigte, wie auch schon an Tag 8.5pc, keine GATA-3-Transkription. Alle „sense“-Kontrollen zeigten keine Signale.

Zusammenfassend findet eine Kompartimentisierung der Expression von GATA-3 zwischen dem embryonalen und extraembryonalen Gewebe statt. Allerdings tritt an Tag 7.5dpc erneut eine transiente Expression von GATA-3 im embryonalen Gewebe auf, die dann ab Stadium 9.5dpc nicht mehr nachweisbar ist.

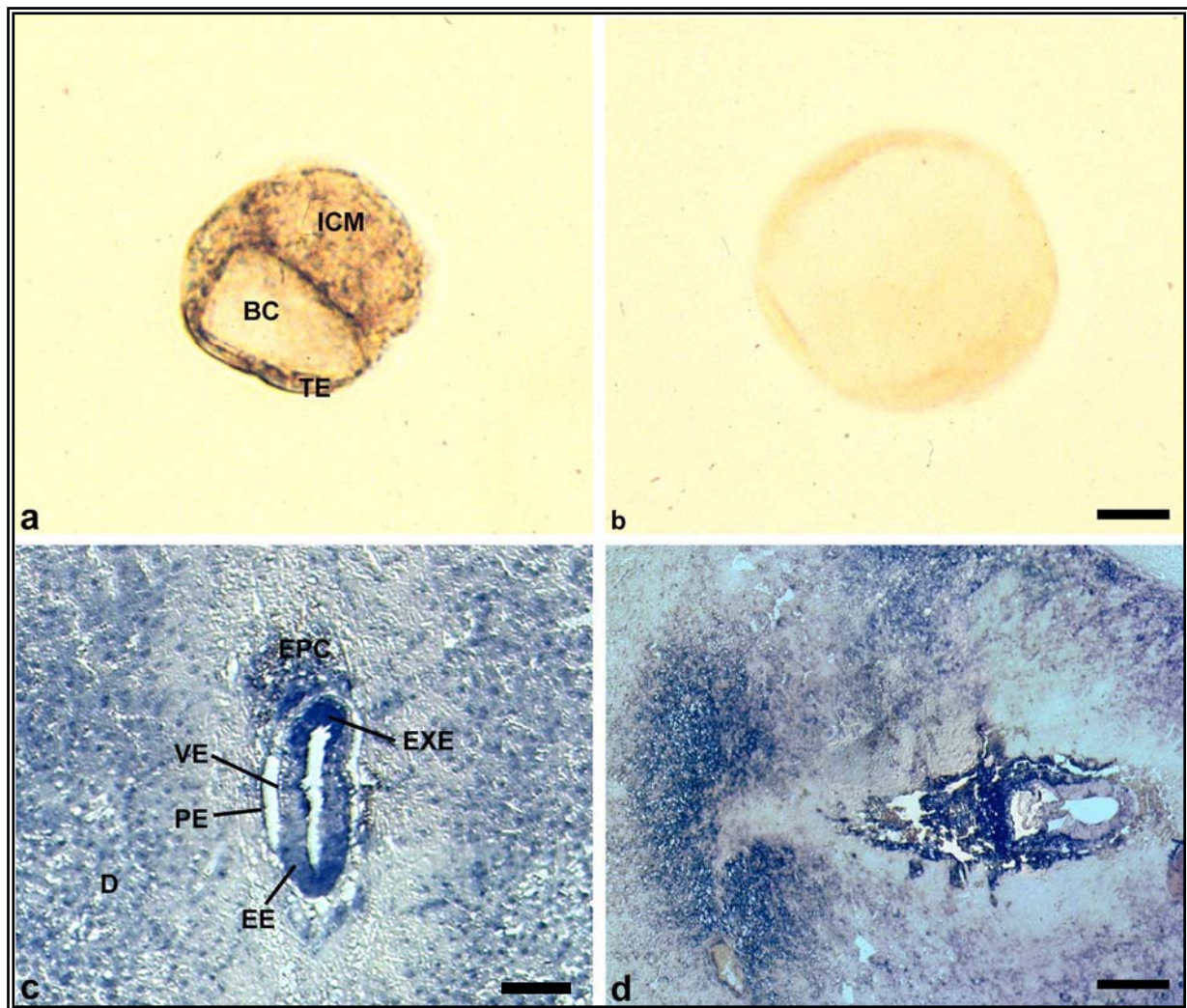


Abb.7 a und b: In situ Hybridisierung von GATA-3 während der Präimplantationsphase an Blastozysten. Es zeigt sich ein deutliches Signal in der inneren Zellmasse (ICM) und dem Trophektoderm (TE) (a). Kontrolle (b).

c und d: In situ Hybridisierung von GATA-3 in der Postimplantationsphase an Paraffinschnitten. An Tag 6.5pc (c) zeigt sich eine Expression im Ekto-plazentarkonus (EPC), sowie im extraembryonalen Ektoderm (EXE), in der Dezidua (D) und dem embryonalen Ektoderm (EE). Das viszerale und parietale Endoderm (VE und PE) weisen keine bis fragliche Expression auf.

An Tag 7.5pc (d) ist keine Expression mehr im embryonalen Ektoderm (EE) nachzuweisen. Die Expression konzentriert sich auf den Ekto-plazentarkonus (EPC), sowie das extraembryonale Ektoderm (EXE) und das parietale sowie viszerale Endoderm (PE, VE) (siehe auch Abb. 7). Die Expression in der Dezidua ist besonders im mesometrialen Anteil vertreten. (Balken a und b = 30 μ m, Balken c = 100 μ m, Balken d = 200 μ m)

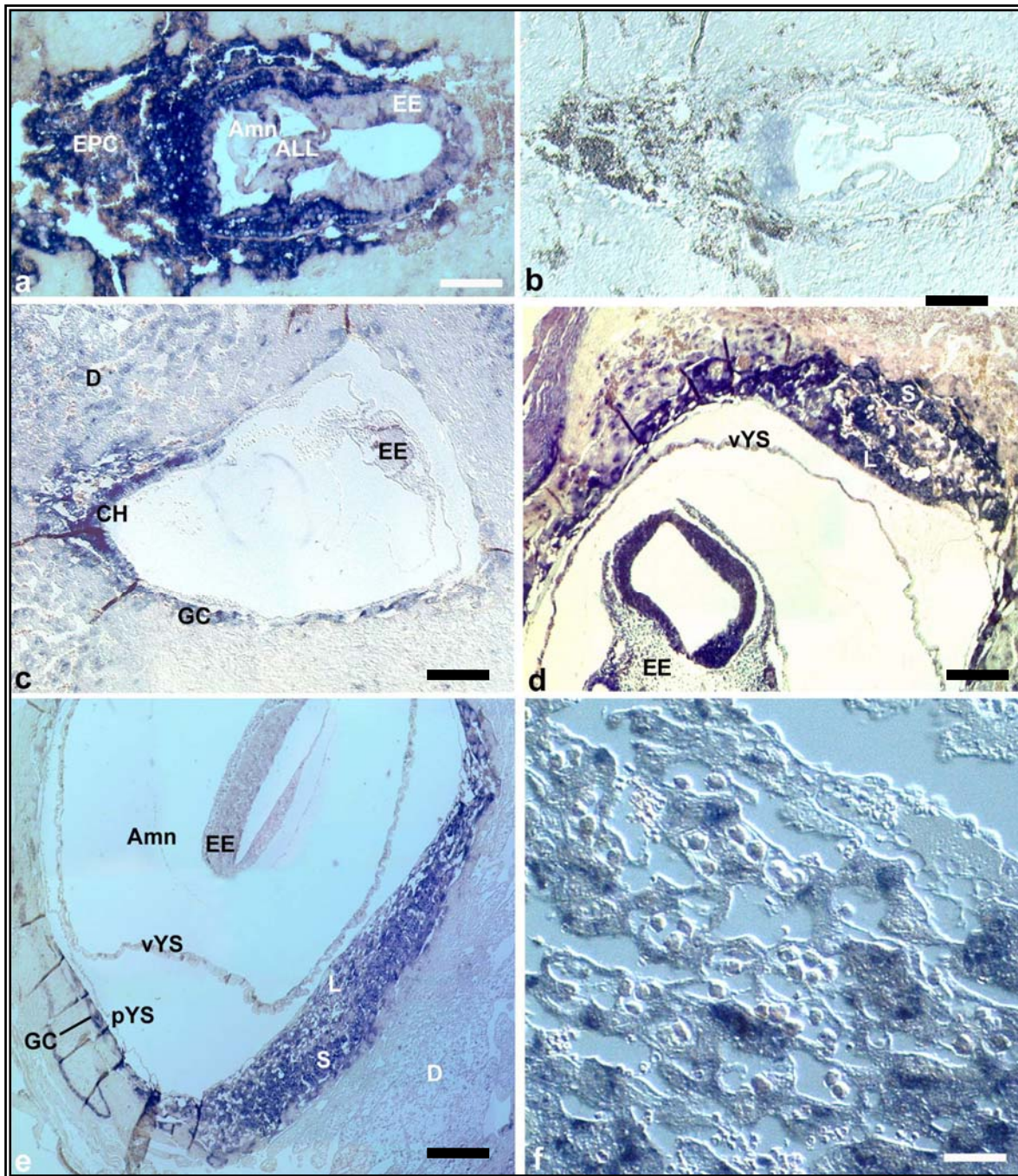


Abb.8 a-f: In situ Hybridisierung von GATA-3 in der Postimplantationsphase an Paraffinschnitten. An Tag 7.5pc zeigt sich eine Expression im Ektoplazentarkonus (EPC) im extraembryonalen Ektoderm (EXE), in den Trophoblastriesenzellen, sowie im parietalen und viszeralen Endoderm. Kein Signal ist im embryonalen Ektoderm (EXE), im extraembryonalen Mesoderm (EXM) und in der Allantois (ALL) zu verzeichnen (a). Die Kontrolle an Tag 7.5pc (b) zeigt kein GATA-3 mRNA-Signal. Im Stadium 8.5dpc (c) lässt sich ein Signal in der Chorionplatte (CH) ausmachen, ebenso lässt sich in den Trophoblastriesenzellen (GC) und der Dezidua (D) eine Expression nachweisen. Der Tag 9.5pc (d) zeigt neben dem Signal im Labyrinth (L) und dem Spongiotrophoblasten (S), sowie der Trophoblastriesenzellen (GC) ebenso ein Signal in den embryonalen Strukturen (EE). Auch der viszerale Anteil des Dottersacks (vYS) zeigt Expression. An Tag 10.5pc (e, f) ist keine GATA-3-mRNA mehr in den embryonalen Geweben und dem viszeralen Dottersack mehr nachweisbar. Die Expression in der Plazenta besteht weiterhin. Balken a bis c = 100µm, Balken d = 150µm, Balken e = 200µm, Balken f = 12.5µm)

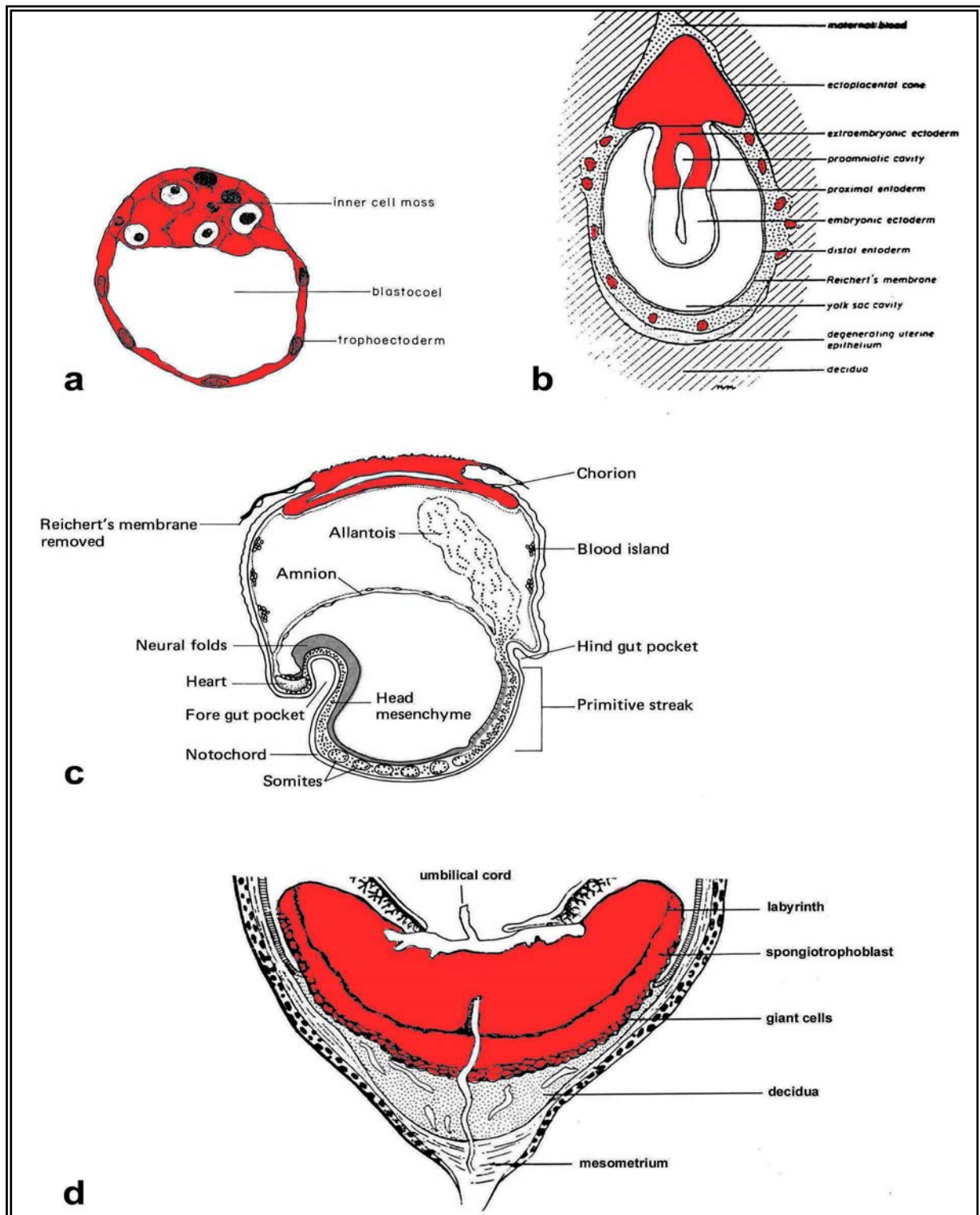


Abb.9: a-d: Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 während der Prä- und Postimplantationsphase.

- (a) 3.5dpz Blastozyste. Expression in der inneren Zellmasse und dem Trophektoderm.
 - (b) 6.5dpz Eizylinderstadium, Bildung der primären Trophoblastriesenzellen und Vorhandensein des Ektoplazentarkonus.
 - (c) 8.5dpz Bevorstehende Bildung der chorioallantoiden Plazenta durch Verschmelzung von Allantois und Chorionplatte.
 - (d) 10.5dpz Plazenta bestehend aus Labyrinth, Spongiotrophoblast und Trophoblastriesenzellen
- (a, c und d nach Rugh, 1990, b nach Müntener und Hsu, 1977)

3.1.3 Expression des Transkriptionsfaktors Esx1

Während der Präimplantationsphase konnte die mRNA des Homeoboxtranskriptionsfaktors Esx1 sowohl in der ICM, als auch im Trophektoderm (TE) nachgewiesen werden. Hierbei schien es, dass eine stärkere Expression in der ICM und im muralen Trophektoderm im Vergleich zum polaren Trophektoderm vorliegt. Dieses könnte allerdings auch durch die unterschiedliche Dichte der Zellpopulationen bedingt sein. In der Kontrolle zeigten sich keine mRNA-Signale (Abb. 10).

In der Postimplantationsphase blieb die Expression in den embryonalen und extraembryonalen Geweben erhalten. Hier war besonders die mehr punktförmige Expression mit vorzugsweiser Lokalisation in den Zellkernen im Vergleich zu den anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren auffällig. Diese Art der Expression zog sich durch alle untersuchten Stadien.

Ab Tag 5.5pc bis Tag 6.5pc (siehe Abb. 10) war eine Expression sowohl im embryonalen Ektoderm (EE), als auch dem parietalen und viszerale Endoderm (PE und VE), zu verzeichnen. Es handelt sich hierbei um Zelllinien, die sich aus der ICM differenzieren, die später an der Bildung des parietalen bzw. viszerale Dottersacks (pYS und vYS) beteiligt sind. Das extraembryonale Mesoderm (EXM) zeigte ebenfalls ein mRNA-Signal.

Das extraembryonale Ektoderm (EXE) und der EPC, bei denen es sich um Derivate, die sich aus dem Trophektoderm entwickeln, handelt, wiesen eine Expression von Esx1 auf. Die Dezidua war ebenfalls intensiv gefärbt.

Das Expressionsmuster der Stadien 7.5pc und 8.5pc konnten nicht ausgewertet werden, da die Kontrolle (sense) ein ebenso starkes Signal aufwies wie die antisense. Dieses Problem ließ sich auch nach mehrmaligem Wiederholen unter genauer Überprüfung der einzelnen Arbeitsschritte und Veränderung verschiedener beeinflussender Parameter, wie z.B. Veränderung der Hybridisierungstemperatur, Änderung der Konzentration der mRNA-Sonde oder die Intensivierung der Waschvorgänge, nicht beheben. Vermutlich handelte es sich hier um eine Kreuzreaktion mit einer unbekannten mRNA-Spezies, deren Ursache im Rahmen der Arbeit nicht näher verfolgt wurde.

Eine Aussage zum Expressionsmuster ließ sich erst wieder ab Tag 9.5pc treffen. Hierbei zeigte sich (Abb.11) eine Expression im Labyrinth (L) und im Spongiotrophoblasten (S) der Plazenta, sowie in den GC rund um die Implantationskammer, die sich in allen drei Schichten der Plazenta etwa gleich stark präsentierte. Im viszerale Dottersack (vYS) wiesen vereinzelte Zellen des endodermalen Anteils ein schwaches positives Signal auf. In der Allantois und im Embryo war kein Signal vorhanden.

Zwischen Tag 5.5pc und Tag 9.5pc hatte eine Kompartimentisierung der Esx1-Expression mit einer Restriktion im extraembryonalen Gewebe stattgefunden, deren genauer Zeitpunkt sich aufgrund der nicht auswertbaren Stadien an Tag 7.5pc und 8.5pc nicht näher bestimmen ließ. Tag 10.5pc (Abb. 11) zeigte bis auf das Verschwinden der vereinzelt positiven Signale im Dottersack keine wesentlichen Veränderungen gegenüber Tag 9.5pc.

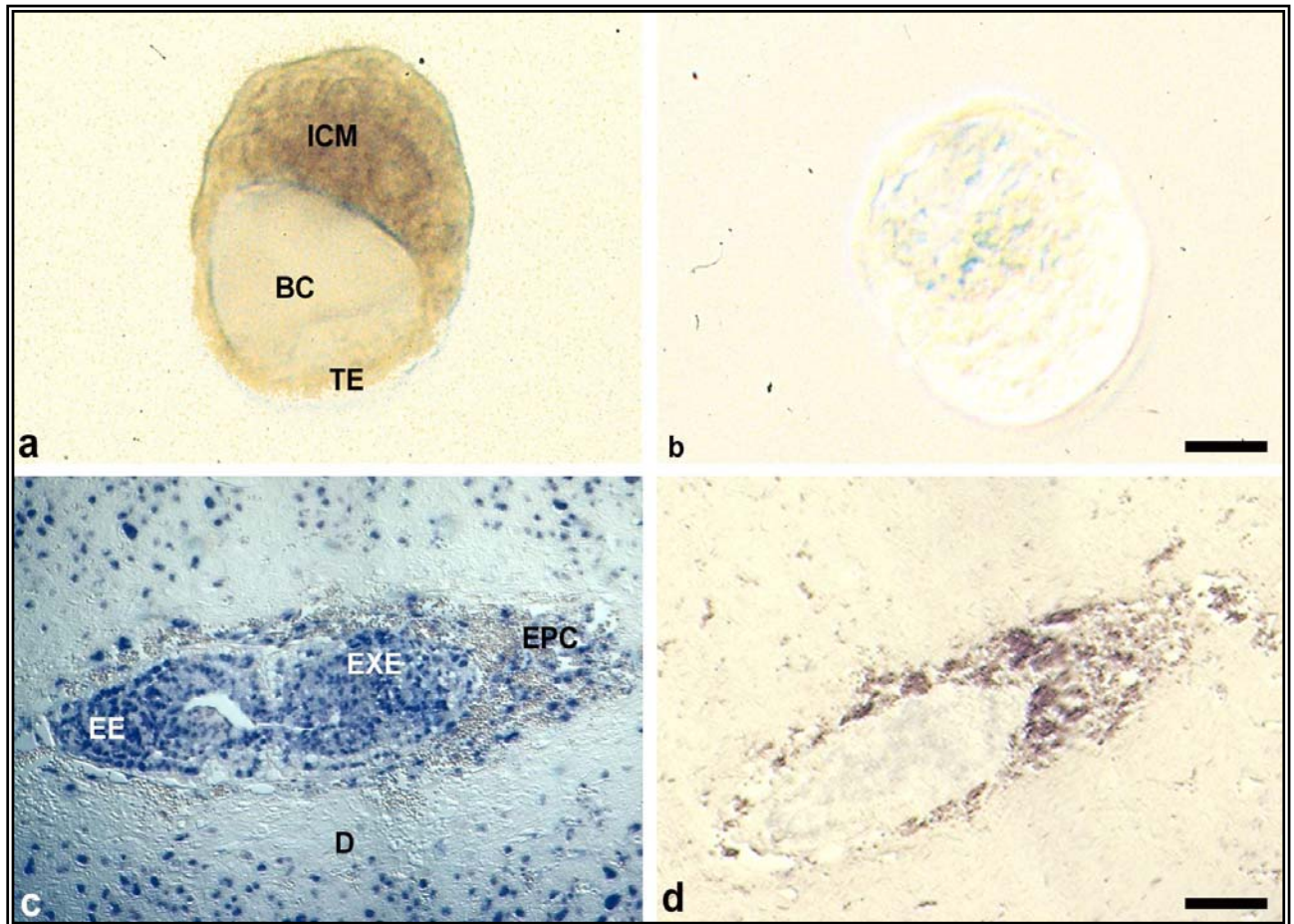


Abb. 10 a-d: In situ Hybridisierung von Esx1 während der Präimplantationsphase an Blastozysten (a und b) und während der Postimplantationsphase an Paraffinschnitten (c und d).

An Tag 3.5pc lässt sich eine Expression von Esx1-mRNA in der inneren Zellmasse (ICM) und etwas schwächer im Trophektoderm (TE) erkennen (a). Die Kontrolle (b) zeigt ein schwaches Hintergrundsignal.

Im Stadium 6.5dpc zeigen sich deutliche Signale im extraembryonalen Ektoderm (EXE), im Ektoplazentarkonus (EPC), im embryonalen Ektoderm (EE), sowie im viszeralen und parietalen Endoderm (c). Die Kontrolle (d) an Tag 6,5pc zeigt keine Expression der Esx1-mRNA. (Balken für a und b = 25µm, Balken c und d = 70µm).

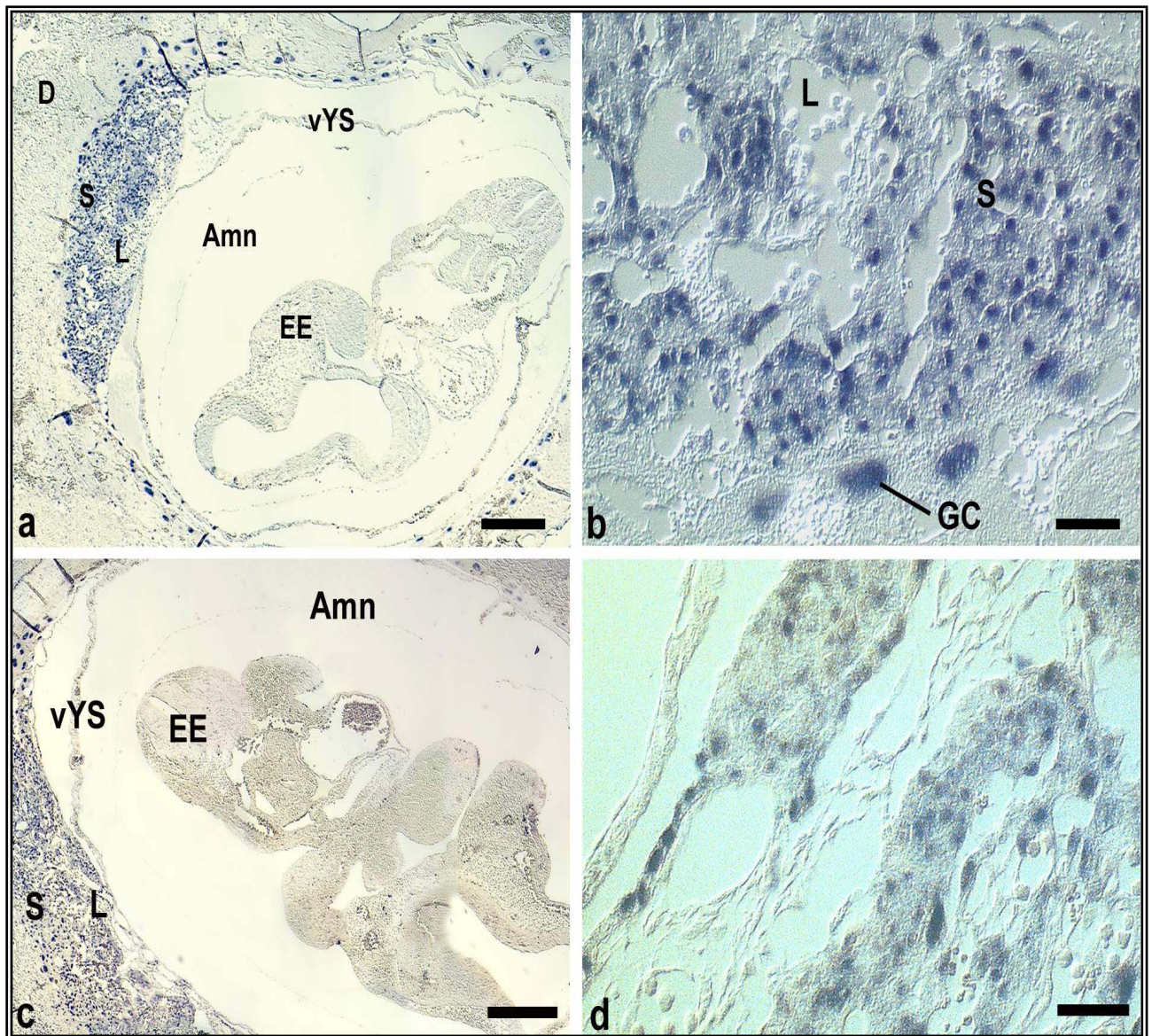


Abb. 11 a-d: In situ Hybridisierung des Transkriptionsfaktoren Esx1 während der Postimplantationsphase an Paraffinschnitten.

Das Expressionsmuster von Esx1 an den Tagen 9.5pc (a und b) und 10.5pc (c und d) zeigen im Wesentlichen ein ähnliches Verteilungsmuster. An beiden Tagen zeigt sich eine deutliche Expression in der Plazenta, d.h. im Spongiotrophoblast (S), im Labyrinth (L) und in den Trophoblastriesenzellen (GC). An Tag 9.5pc (a) ist noch eine schwache Expression im viszeralen Dottersack (vYS) und im Amnion (Amn) auszumachen. In den Vergrößerungen (b und d) fällt auf, dass sich das Signal nicht wie bei den anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma der Zellen, sondern in den Nuclei der Zellen befindet. (Balken für a und c = 200µm, Balken für b und d = 12.5µm)

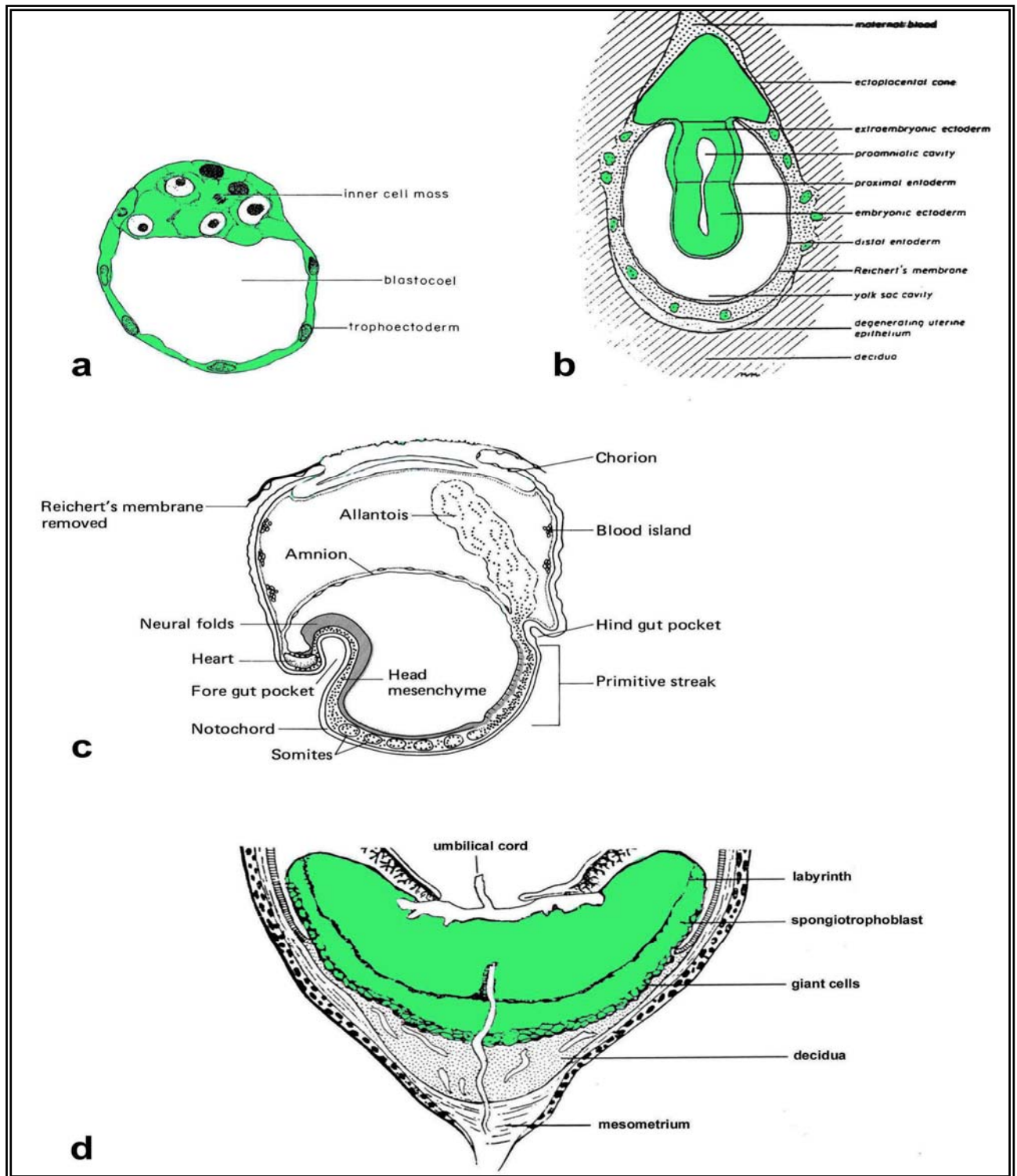


Abb. 12: a-d: Expression des Transkriptionsfaktors Esx1 während der Prä- und Postimplantationsphase.

- (a) 3.5dpv Blastozyste. Expression in der inneren Zellmasse und dem Trophektoderm.
 - (b) 6.5dpv Eizylinderstadium, Bildung der primären Trophoblastriesenzellen und Vorhandensein des Ektoplazentarkonus.
 - (c) 8.5dpv Bevorstehende Bildung der chorioallantoiden Plazenta durch Verschmelzung von Allantois und Chorionplatte. Die Ergebnisse waren aufgrund einer Kreuzreaktion nicht verwertbar, so dass hier keine Expressionsmuster angegeben werden kann.
 - (d) 10.5dpv Plazenta bestehend aus Labyrinth, Spongiotrophoblast und Trophoblastriesenzellen
- (a, c und d nach Rugh, 1990, b nach Müntener und Hsu, 1977)

3.1.4 Expression des Transkriptionsfaktors Pem

Die mRNA des Transkriptionsfaktors Pem konnte in der Blastozyste der Maus in der ICM und im Trophektoderm (TE) lokalisiert werden.

Am Tag 5.5pc (siehe Abb. 13) zeigte sich ein Signal im EPC. Die GC, die im Folgenden mit dem parietalen Endoderm den parietalen Dottersack (pYS) bilden, wiesen ein Pem-Signal auf. Zusätzlich konnte eine Expression im extraembryonalen Ektoderm (EXE) sowie eine hohe Expression der Pem mRNA in der Dezidua verzeichnet werden. Das viszerale Endoderm zeigte kein positives Signal.

Am Tag 6.5pc (siehe Abb. 13) kam zu der Expression im EPC, dem extraembryonalen Ektoderm (EXE), den GC und der Dezidua ein schwaches Signal im embryonalen Ektoderm (EE) sowie im extraembryonalen Mesoderm (EXM) hinzu. Die schwache Expression im embryonalen Ektoderm war am folgenden Tag (7.5pc) nicht mehr vorhanden, während nun eine schwache Expression im viszeralen Endoderm zu verzeichnen war. Ansonsten entsprach das Expressionsmuster dem am Tag 6.5pc gezeigten. Allerdings ließ sich über die Expression in der Allantois keine Aussage treffen, da sie während der Präparation nicht erhalten wurde.

Im Stadium 8.5dpc, in dem sich das Chorion (CH) formiert hat, konnte eine deutliche Markierung der beiden Schichten des Chorions, sprich dem mesodermalen und dem endodermalen Anteil nachgewiesen werden. Das Amnion (Amn), das ebenfalls aus einer mesodermalen und einer ektodermalen Schicht besteht, war gefärbt. Der viszerale Dottersack (vYS), der den Embryo bis zur Etablierung der chorioallantoiden Plazenta ernährt, war in seiner mesodermalen Schicht deutlicher mRNA-positiv als die endodermale Schicht und auch der parietale Dottersack (pYS) und die GC zeigten ein mRNA-Signal. Die Markierung im embryonalen Gewebe war nicht eindeutig zu identifizieren. Im Vergleich zur umgebenden Dezidua konnte man von einer schwachen Färbung ausgehen.

Die Stadien 9.5dpc und 10.5dpc zeigten im Wesentlichen das gleiche Expressionsmuster in der Plazenta, allerdings war die Färbung an Tag 10.5pc intensiver ausgeprägt. Die Plazenten dieser beiden Stadien zeigten eine positive Markierung der GC, des Spongiotrophoblasten (S) und des Labyrinths (L). Das embryonale Gewebe wies keine Expression von Pem auf. Auch der viszerale Dottersack zeigte kein positives mRNA-Signal, wohingegen im Amnion weiterhin eine positive Reaktion zu erkennen war.

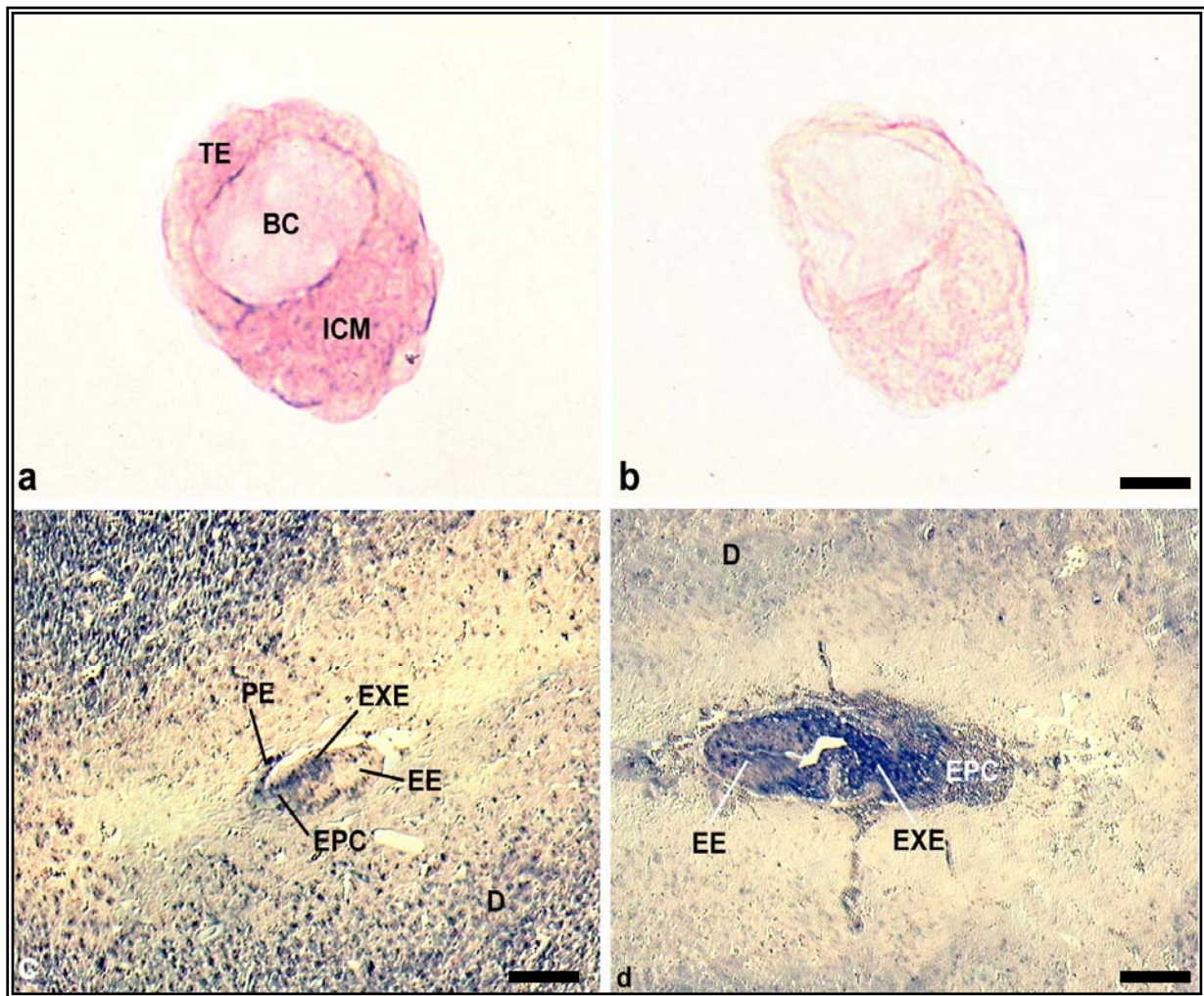


Abb. 13 a-d: In situ Hybridisierung des Transkriptionsfaktors Pem während der Präimplantationsphase an Blastozysten und während der Präimplantationsphase an Paraffinschnitten.

An Tag 3.5pc im Blastozystenstadium zeigt sich ein Signal im Trophektoderm (TE) und der inneren Zellmasse (ICM) (a). Die sense zeigt ein leichtes background-Signal (b).

Im Stadium 5.5dpc zeigt sich eine Expression des Transkriptionsfaktors Pem hauptsächlich in den Derivaten des Trophektoderm (EPC, EXE, ,GC), aber auch im parietalen Endoderm, einem Derivat der inneren Zellmasse (c). Ebenso ist ein deutliches Signal in der Dezidua zu erkennen (c).

An Tag 6.5pc zeigt sich das gleiche Expressionsmuster. Es tritt lediglich eine leichte Anfärbung des embryonalen Ektoderms auf, das aber eher als background-Signal zu werten ist (d). (Balken für a und b = 25µm, Balken für c = 90µm Balken für d = 60µm)

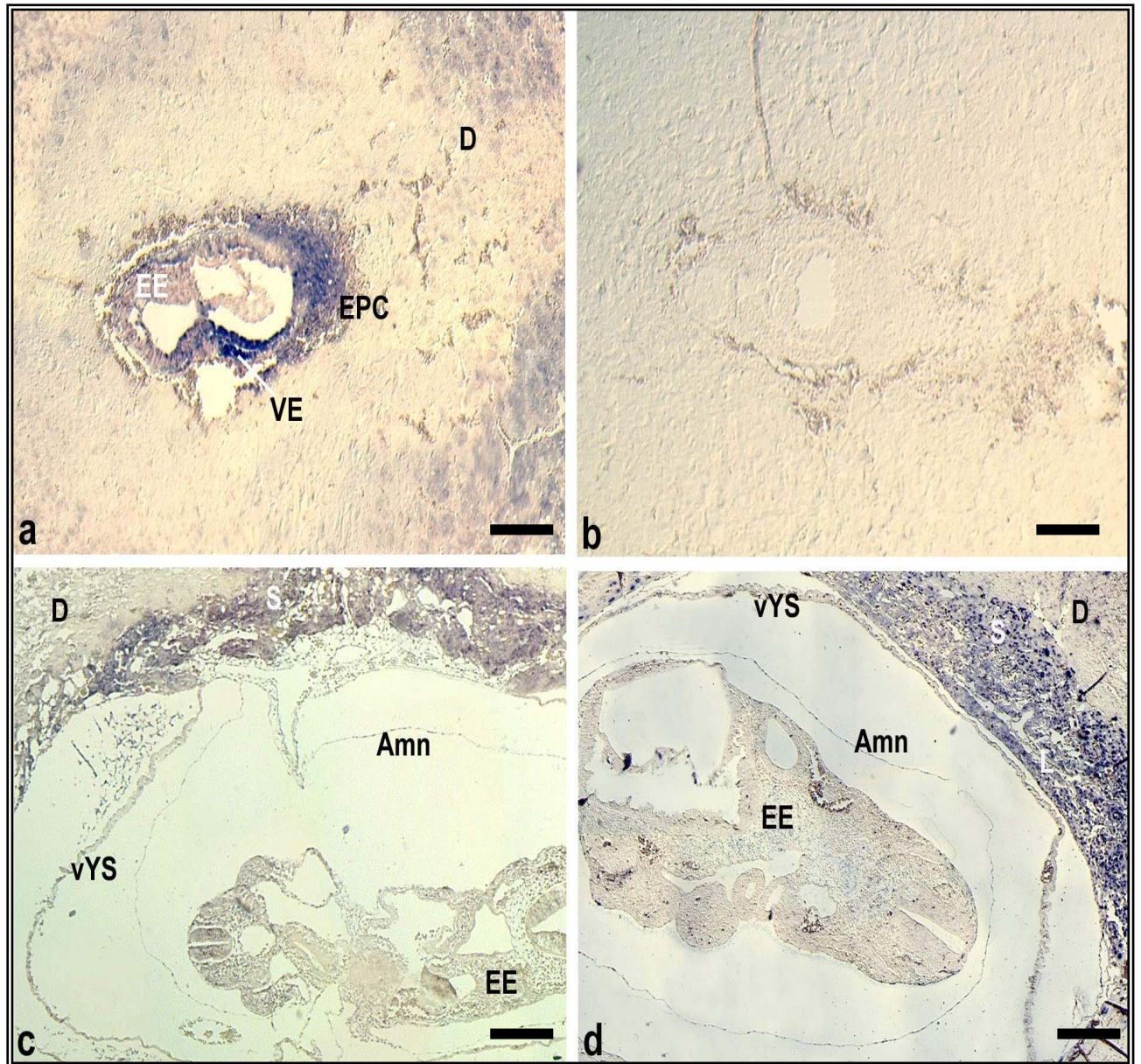


Abb. 14 a-d: In situ Hybridisierung des Transkriptionsfaktors Pem während der Postimplantationsphase an Paraffinschnitten.

Tag 7.5pc zeigt eine deutliche Expression im Ektoplazentarkonus (EPC), sowie im extraembryonalen Ektoderm (EXE). Auch das viszerale Endoderm (VE) zeigt ein Signal (a). Die Kontrolle (sense) weist keinerlei Signal auf (b).

An Tag 9.5pc (c) und 10.5pc (d) zeigt sich eine deutliche Expression im Labyrinth (L), dem Spongiotrophoblasten (S) und den Trophoblastriesenzellen (GC). Ebenso zeigt das Amnion (Amn) an beiden Tagen ein Signal. (Balken für a und b = 170µm, Balken c und d = 200µm).

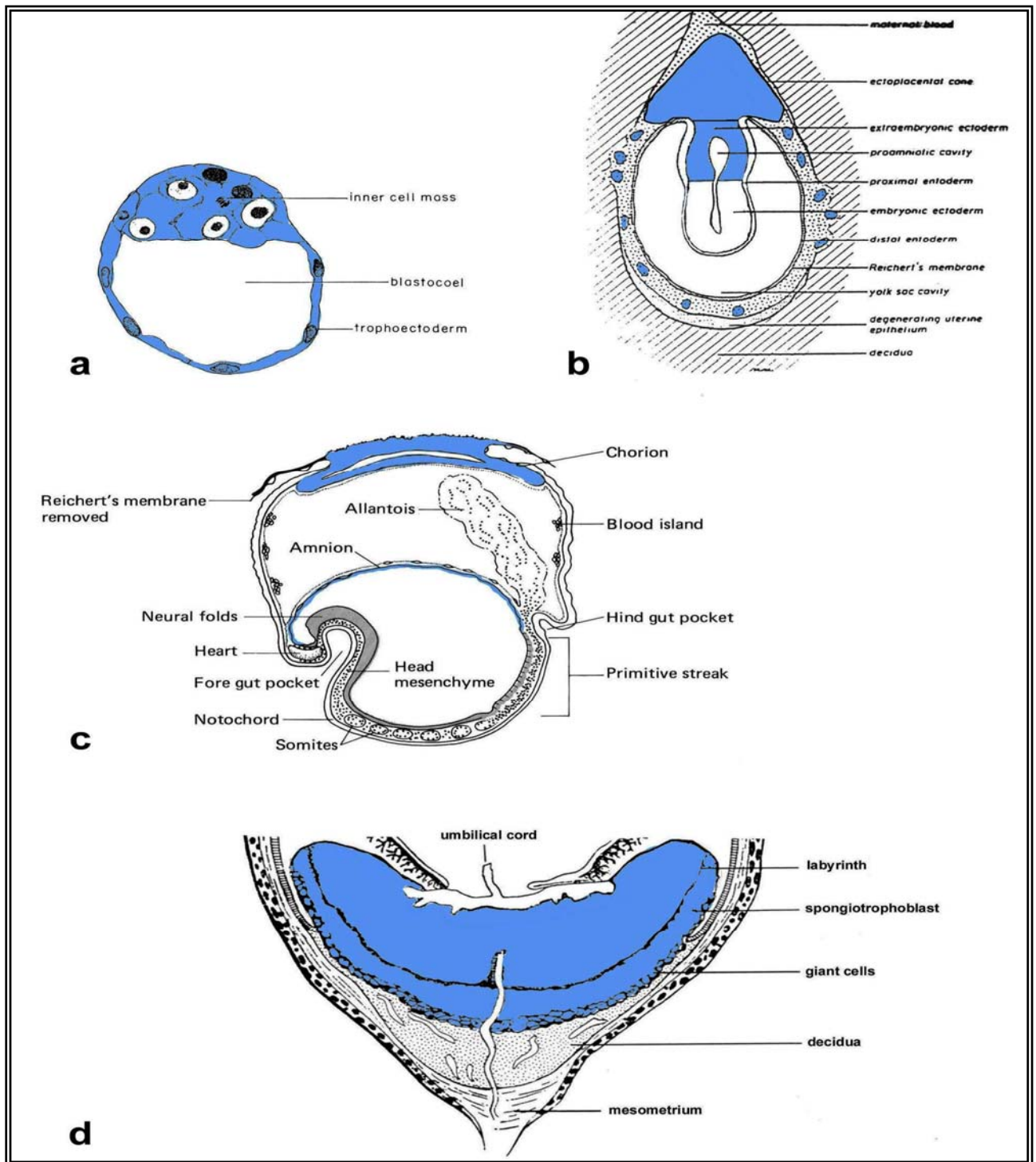


Abb.6: a-d: Expression des Transkriptionsfaktors Pem während der Prä- und Postimplantationsphase.

- (a) 3.5dpc Blastozyste. Expression in der inneren Zellmasse und dem Trophektoderm.
 - (b) 6.5dpc Eizylinderstadium, Bildung der primären Trophoblastriesenzellen und Vorhandensein des Ekto-plazentarkonus.
 - (c) 8.5dpc Bevorstehende Bildung der chorioallantoiden Plazenta durch Verschmelzung von Allantois und Chorionplatte.
 - (d) 10.5dpc Plazenta bestehend aus Labyrinth, Spongiotrophoblast und Trophoblastriesenzellen
- (a, c und d nach Rugh, 1990, b nach Müntener und Hsu, 1977)

3.1.5 Gegenüberstellung der Expressionsmuster der untersuchten

Transkriptionsfaktoren

Bei den Untersuchungen in der Präimplantationsphase, gab es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Expressionsmustern der verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren wurden sowohl in der ICM als auch im Trophektoderm exprimiert. Kleinere Unterschiede gab es jedoch in der Intensität des Signals, wobei allerdings eine wirkliche Quantifizierung der Expression mit der ISH nicht möglich ist. Während die Transkriptionsfaktoren GATA-3, Esx1 und Pem eine relativ intensive Färbung zeigten, war GATA-2 eher schwach angefärbt.

In der Postimplantationsphase sollte das Expressionsmuster der einzelnen untersuchten Transkriptionsfaktoren besonders auf eine Kompartimentisierung zwischen der Plazentaanlage und dem Embryo hin untersucht werden. Die Expression im EPC, den GC und dem extraembryonalen Ektoderm (EXE) blieben im untersuchten Zeitraum von Tag 5.5pc bis zum Tag 7.5pc unverändert. In diesen drei Geweben, die alle aus dem Trophektoderm hervorgegangen sind und damit zu den extraembryonalen Geweben gezählt werden, zeigten alle vier Transkriptionsfaktoren ein deutliches mRNA-Signal. Esx1 konnte nur an Tag 5.5pc und 6.5pc beurteilt werden, da die Kontrollen an den zwei darauffolgenden Tagen ein zu starkes Hintergrundsignal aufwiesen.

Das extraembryonale Mesoderm (EXM), das der ICM entstammt und ab Tag 6.5pc zu erkennen war, zeigte zunächst bei allen Transkriptionsfaktoren eine starke Expression, die für GATA-2 und für Pem auch am darauf folgenden Tag noch anhielt, nicht aber für GATA-3. Das Amnion (Amn), dessen mesodermaler Anteil dem extraembryonalen Mesoderm entstammt, zeigt im Stadium 8.5dpc sowohl bei GATA-2 als auch bei Pem ein positives mRNA-Signal.

Betrachtete man das viszerale Endoderm (VE) und den viszeralen Dottersack (vYS), der sich aus dem viszeralem Endoderm und dem viszeralem Mesoderm, das sich wiederum aus dem extraembryonalen Mesoderm differenziert, zusammensetzt, so konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Transkriptionsfaktoren festgehalten werden. Soweit beurteilbar lässt sich lediglich bei Esx1 eine durchgehende Expression feststellen. Die anderen drei untersuchten Transkriptionsfaktoren zeigten eine variable Expression im viszeralem und parietalem Endoderm. An Tag 7.5dpc zeigten dann allerdings sowohl Pem, als auch GATA-2 und GATA-3 einheitlich ein Signal in beiden Geweben.

Im viszeralem Dottersack war die GATA-2-Expression von Tag 8.5pc bis zum letzten untersuchten Stadium, allerdings mit abnehmender Expressionsstärke, zu beobachten. Gata-3

zeigte im viszeralem Endoderm nur an Tag 5.5pc und 7.5pc ein positives mRNA-Signal. Bei der Betrachtung des viszeralem Dottersacks an den Tagen 8.5pc und 10.5pc war weder im mesodermalen noch im endodermalen Anteil eine GATA-3-Expression feststellbar. Lediglich an Tag 9.5pc zeigte sich eine Reexpression sowohl im endodermalen, als auch im mesodermalen Anteil des viszeralem Dottersacks.

Auch der Transkriptionsfaktor Esx1, der im extraembryonales Mesoderm und im viszeralem Endoderm am Tag 6.5pc zu detektieren war, wies an Tag 9.5pc eine Expression der mRNA im mesodermalen sowie im endodermalen Anteil des viszeralem Dottersacks auf. Die Stadien 7.5pc und 8.5pc konnten aufgrund der erwähnten wahrscheinlichen Kreuzreaktion nicht ausgewertet werden.

Am folgenden Tag war lediglich die Expression im mesodermalen Anteil des viszeralem Dottersacks zu detektieren. Bei dem Transkriptionsfaktor Pem zeigte sich erst ab Tag 7.5pc eine eher schwache Expression der mRNA im viszeralem Endoderm.

Auch im Stadium 8.5dpc setzte sich die Expression im viszeralem Dottersack sowohl im mesodermalen, als auch im endodermalen Teil, dort im Vergleich etwas schwächer fort. Ab Tag 9.5pc war das mRNA-Signal nicht mehr zu detektieren.

In der Chorionplatte, die sich aus dem extraembryonalen Ektoderm sowie dem extraembryonalen Mesoderm entwickelt, ließ sich bei GATA-2, GATA-3 und Pem eine stärkere Expression im endodermalen Anteil nachweisen, während im mesodermalen Anteil nur vereinzelt Zellen ein Signal aufwiesen.

Die chorioallantoide Plazenta der Maus, die ab dem neunten Tag die Dottersackplazenta in ihrer ernährenden Funktion ablöst, zeigte bei allen vier untersuchten Transkriptionsfaktoren im Labyrinth und im Spongiotrophoblasten ein deutliches Signal, das auf eine mRNA-Expression der entsprechenden Faktoren schließen ließ. Auch waren die GC weiterhin mit einer starken Expression vertreten.

Nur bei dem Transkriptionsfaktor Pem fand eine Kompartimentisierung direkt nach der Implantation statt. Hier exprimierte ausschließlich das extraembryonale Gewebe die mRNA des Transkriptionsfaktors. Der Homeoboxfaktor Esx1 zeigte in den auswertbaren Stadien an Tag 5.5pc und 6.5pc eine starke Expression im embryonalen Gewebe. Diese war weder an Tag 9.5pc noch am darauf folgenden Tag weiterhin nachweisbar. Hier kam es also erst zu einem späteren Zeitpunkt der Postimplantationsphase zu einer Kompartimentisierung.

Die beiden Zinkfingertranskriptionsfaktoren zeigten ein ähnliches Expressionsmuster. Beide wiesen an Tag 5.5pc eine starke Expression im embryonalen Ektoderm auf. Bei GATA-2 war diese an den beiden darauffolgenden Tagen nicht mehr nachweisbar. Das gleiche Muster galt

für den Transkriptionsfaktor GATA-3, wobei hier die Expression einen Tag später begann, d.h. in den Stadien 7.5dpc und 8.5dpc war hier keine Expression zu verzeichnen. Während bei GATA-2 an Tag 8.5pc und 9.5pc erneut ein mRNA-Signal, zu beobachten war, war dies bei GATA-3 erst an Tag 9.5pc möglich. Auch in Stadium 10.5dpc wies GATA-2 eine deutliche Expression der mRNA auf, während das Signal der GATA-3 mRNA nicht mehr zu detektieren war.

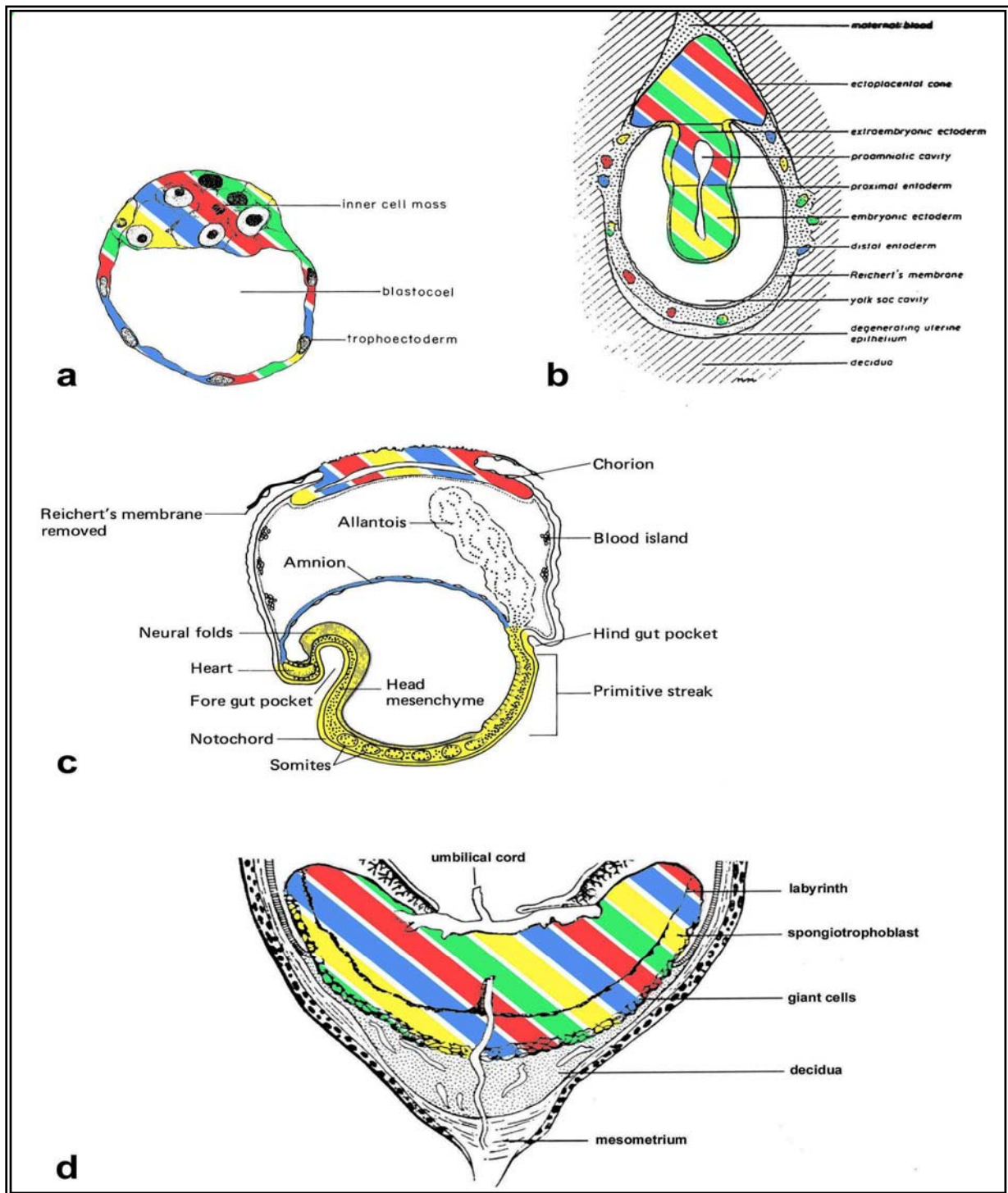


Abb.6: a-d: Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-2 (gelb), GATA-3 (rot), Esx1 (grün) und Pem (blau) während der Prä- und Postimplantationsphase.

- (a) 3.5dp Blastozyste. Expression in der inneren Zellmasse und dem Trophektoderm.
 - (b) 6.5dp Eizylinderstadium, Bildung der primären Trophoblastriesenzellen und Vorhandensein des Ektoplazentarkonus.
 - (c) 8.5dp Bevorstehende Bildung der chorioallantoiden Plazenta durch Verschmelzung von Allantois und Chorionplatte.
 - (d) 10.5dp Plazenta bestehend aus Labyrinth, Spongiotrophoblast und Trophoblastriesenzellen
- (a, c und d nach Rugb, 1990, b nach Müntener und Hsu, 1977)

3.1.6 Tabellarische Gegenüberstellung der Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren

3.5dpc	ICM	TE
Gata-2	+	+
Gata-3	+	+
Esx1	+	+
Pem	+	+

Tabelle 3: Expressionsmuster der untersuchten Transkriptionsfaktoren an Tag 3.5pc, ICM = innere Zellmasse, TE = Trophektoderm, + = Expression, / = keine Expression.

	Derivate des Trophektoderm			Derivate der Inneren Zellmasse			
5.5 dpc	EPC	GC	EXE	VE	PE	EE	D
Gata-2	+	+	+	+	+	+	+
Gata-3	+	+	+	+	+	/	+
Esx1	+	+	+	+	+	+	+
Pem	+	+	+	/	+	/	+

Tabelle 4: Expressionsmuster der untersuchten Transkriptionsfaktoren an Tag 5.5pc, EPC =Ektoplazentarkonus, GC = Trophoblastriesenzellen, EXE = Extraembryonales Ektoderm, VE = Viszeriales Endoderm, PE = Parietales Endoderm, EE = Embryonales Ektoderm, D = Decidua, + = Expression, / = keine Expression.

	Derivate des Trophektoderm				Derivate der Inneren Zellmasse			
6.5 dpc	EPC	GC	EXE	EXM	VE	PE	EE	D
Gata-2	+	+	+	+	+	/	/	+
Gata-3	+	+	+	+	/	/	+	+
Esx1	+	+	+	+	+	+	+	+
Pem	+	+	+	+	/	+	+	+

Tabelle 5: Expressionsmuster der untersuchten Transkriptionsfaktoren an Tag 6.5pc, EPC =Ektoplazentarkonus, GC = Trophoblastriesenzellen, EXE = Extraembryonales Ektoderm, EXM = Extraembryonales Mesoderm, VE = Viszeriales Endoderm, PE = Parietales Endoderm, EE = Embryonales Ektoderm, D = Decidua, + = Expression, / = keine Expression.

	Derivate des Trophektoderm			Derivate der Inneren Zellmasse					
7.5 dpc	EPC	GC	EXE	EXM	VE	PE	EE	ALL	D
Gata-2	+	+	+	+	+	+	/	KA	+
Gata-3	+	+	+	/	+	+	/	/	+
Esx1	KA	KA	KA	KA	KA	KA	KA	KA	KA
Pem	+	+	+	+	+	+	/	KA	+

Tabelle 6: Expressionsmuster der untersuchten Transkriptionsfaktoren an Tag 7.5pc, EPC = Ektoplazentarkonus, GC = Trophoblastriesenzellen, EXE = Extraembryonales Ektoderm, EXM = Extraembryonales Mesoderm, VE = Viszerales Endoderm, PE = Parietales Endoderm, EE = Embryonales Ektoderm, ALL = Allantois, D = Decidua, KA = keine Aussage möglich, + = Expression, / = keine Expression.

	Derivate des Trophektoderm	Derivate der Inneren Zellmasse					
8.5 dpc	GC	CH	vYS	pYS	Amn	EE	D
Gata-2	+	+	+	+	+	+	+
Gata-3	+	+	/	/	/	/	+
Esx1	KA	KA	KA	KA	KA	KA	KA
Pem	+	+	+	+	+	/	+

Tabelle 7: Expressionsmuster der untersuchten Transkriptionsfaktoren an Tag 8.5pc, CH = Chorionplatte, GC = Trophoblastriesenzellen, vYS = viszeraler Dottersack, pYS = parietaler Dottersack, Amn = Amnion, EE = Embryonales Ektoderm, D = Decidua, KA = keine Aussage möglich, + = Expression, / = keine Expression.

	Derivate des Trophektoderm			Derivate der Inneren Zellmasse				
9.5 dpc	L	S	GC	vYS	pYS	Amn	EE	D
Gata-2	+	+	+	+	/	+	+	+
Gata-3	+	+	+	+	+	/	+	+
Esx1	+	+	+	+	+	+	/	+
Pem	+	+	+	/	+	+	/	/
10.5 dpc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--
Gata-2	+	+	+	+	+	/	+	+
Gata-3	+	+	+	/	/	/	/	/
Esx1	+	+	+	/	/	/	/	+
Pem	+	+	+	/	+	+	/	/

Tabelle 8: Expressionsmuster der untersuchten Transkriptionsfaktoren an Tag 9.5pc und 10.5pc, L = Labyrinth, S = Spongiotrophoblast, GC = Trophoblastriesenzellen, vYS = Viszeraler Dottersack, pYS = parietaler Dottersack, Amn = Amnion, EE = Embryonales Ektoderm, D = Decidua, + = Expression, / = keine Expression.

4 Diskussion

Viele Connexine, so z.B. Cx30, 30.3, 31, 31.1, 40 und 45 sowie Cx36 und Cx57 werden während des präimplantativen Stadiums in der Blastozyste exprimiert (Davies et al., 1996; Dahl et al., 1996a; Srinivas et al., 1999; Manthey et al., 1999). Eine unterschiedliche Expression in den verschiedenen Geweben („sorting out“), die zum einen der ICM und zum anderen dem Trophektoderm entstammen, erfolgt dann während der Trophoblastinvasion in das Endometrium des Uterus. Die Regulationsmechanismen, die diese Aussortierung und Kompartimentisierung der Connexine, die sich sowohl experimentell durch Farbstoffausbreitung als auch durch elektrische Kopplung nachweisen lassen, ermöglichen, sind noch weitestgehend unbekannt (Kalimi und Lo, 1998). Es gibt verschiedene Ansätze, die mögliche regulierende Faktoren aufzeigen. Zu nennen wären hier z.B. eine mögliche Modulation von Cx26 und Cx43 durch Progesteron und Östrogen bei der Ratte, eine Beeinflussung der Expression von Cx31 und Cx43 in F9 embryonalen Karzinomzellen durch Retinsäure, einem Vitamin A-Derivat und auch eine Beeinflussung der Connexinexpression durch Transkriptionsfaktoren (Grümmer et al., 1996 a und b).

Dieser Regulationsmechanismus wird schon seit längerer Zeit diskutiert, so wird beispielsweise die Cx43-Expression während der Präimplantationsphase unter anderem durch den Transkriptionsfaktor Octamer-4 (Oct-4) der POU-Familie reguliert (Schöler, 1991). Postimplantativ zeigt Oct-4 wie Cx43 ein „sorting out“ in das embryonale Gewebe (Dahl et al., 1996b).

Auch der Transkriptionsfaktor Mash-2, ein Helix-loop-helix (bHLH)-Transkriptionsfaktor weist eine deutliche Übereinstimmung des Expressionsmusters mit dem des Cx31 auf. Allerdings zeigten hier Untersuchungen mit cotransfizierten Rcho-1-Zellen der Trophoblastzelllinie, dass eine Überexpression von Mash-2 keine Beeinflussung der Promotor – bzw. der Intronregion von Cx31 nach sich zieht (Gabriel et al., 2001). Für Cx31 sind bei der Ratte weiterhin Bindungsstellen für GATA-3 in der putativen Promotorregion bekannt, wobei eine Überexpression von GATA-3 keinen Effekt auf die Aktivität des Intronkonstruktes in Rcho-1-Zellen ausübt (Gabriel et al., 2001).

Zur Eingrenzung weiterer Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise an der Regulation der Connexinexpression während der Entwicklung der Maus beteiligt sein könnten, wurden hier vier Transkriptionsfaktoren in ihrem Expressionsmuster mit Hilfe der nichtradioaktiven ISH während der Prä- und Postimplantationsphase untersucht. All diese Transkriptionsfaktoren sollen maßgeblich an der Regulation von Differenzierungsprozessen beteiligt sein. Bei den

untersuchten Transkriptionsfaktoren handelte es sich um die beiden Zinkfingertranskriptionsfaktoren GATA-2 und GATA-3 und die beiden Homeoboxtranskriptionsfaktoren Esx1 und Pem.

Mit der nichtradioaktiven ISH konnte in den hier vorliegenden Untersuchungen eine Expression des Transkriptionsfaktors Pem in der ICM und dem Trophektoderm nachgewiesen werden. Die Expression des Pem-Proteins in der Präimplantationsphase war teilweise schon bekannt. Nach den veröffentlichten Analysen von Fan et al. (1999) beginnt sie im späten Morulastadium und ist sowohl in der ICM als auch im Trophektoderm vertreten. Für die Faktoren GATA-2 und GATA-3 sowie für den anderen untersuchten Homeoboxfaktor Esx1 war bisher die mRNA-Expression im Präimplantationsstadium unbekannt.

Diese drei Faktoren wiesen eine Expression in der ICM und auch im Trophektoderm auf, wobei die Expression für GATA-2 etwas schwächer ausfiel, als für die anderen untersuchten Faktoren.

Während der Präimplantationsphase der Maus werden ebenfalls, wie im einleitenden Teil dargestellt, die verschiedensten Connexine im Trophektoderm und in der ICM exprimiert. Um ihre Bedeutung in Bezug auf ihre Funktionen und Aufgaben wie z.B. den interzellulären Austausch von niedermolekularen Substanzen und die elektrische Kopplung zwischen den einzelnen Zellen während der Entwicklung genauer zu verifizieren, wurden für einige Connexine, so z.B. für Cx43, defiziente Mäuse generiert (Houghton et al., 2002). Houghton et al., (2002) untersuchten an Cx43 defizienten Mäusen das Präimplantationsstadium in Hinblick auf Apoptose und Glucosetransport und konnten keinen Unterschied zum Wildtyp Cx43 feststellen. Dieses Ergebnis und eine frühere Untersuchung von Vance and Wiley (1999), die Mausembryonen im Präimplantationsstadium mit dem GJ-Kommunikationsinhibitor 18 alpha-glycerrhetinic acid (AGA), beginnend im 4-Zellstadium, behandelten und ebenfalls keine Beeinträchtigung der Entwicklung in der Präimplantationsphase feststellen konnten, suggerieren, dass die GJ-Kopplung für die Präimplantationsentwicklung der Maus entbehrlich ist. Auch andere Connexine, die im Blastozystenstadium exprimiert werden, so z.B. Cx30, 31, 36, 40 und 45 wurden inaktiviert, was zu keinen offensichtlichen Defekten in der präimplantativen Entwicklung führte (Kirchhof et al., 1998; Simon et al., 1998; Kumai et al., 2000; Krüger et al., 2000, Plum et al., 2001).

Über die Bedeutung der hier untersuchten Transkriptionsfaktoren für die Präimplantationsphase ist bisher nur wenig bekannt. Mäuse, die den Homeoboxtranskriptionsfaktoren Pem nicht exprimieren können, zeigen keinerlei Defizite in der Entwicklung des extraembryonalen Gewebes, in dem Pem vorzugsweise bei

Wildtypmäusen exprimiert wird. Pitman et al., (1998) stellten hier die Vermutung auf, dass das Fehlen von Pem durch andere Faktoren, z.B. Esx1, der ein überlappendes Expressionsmuster zu Pem zeigt, kompensiert wird. Defekte bei der Esx1-defizienten Maus treten erst mit Beginn der Plazentation auf, so scheint Esx1 also für die präimplantative Entwicklung eine geringe Bedeutung zu haben (Li und Behringer, 1998).

Auch bei den zurzeit bekannten Connexin-defizienten Mäusen treten die Defekte erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung auf. So kommt es z.B. bei Cx31-defizienten Mäusen erst zu einer sichtbaren Veränderung während der plazentalen Entwicklung und bei Cx43-defizienten Mäusen wird der Defekt, - eine Obstruktion des rechten Ausflusstrakts des rechten Herzens -, erst direkt nach der Geburt relevant (Plum et al., 2001; Reaume et al., 1995). Diese Tatsache, dass sowohl bei den genannten Connexinen und dem Transkriptionsfaktor Esx1 jeweils die Defekte zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung ihr Ausmaß zeigen und dass Esx1 sowie Cx31 beide bevorzugt im extraembryonalen Gewebe exprimiert werden, lässt Esx1 in die engere Auswahl der Transkriptionsfaktoren rücken, die möglicherweise an der Regulation der Connexinexpression beteiligt sein könnten.

Ein Fehlen des Transkriptionsfaktors Pem hat anscheinend keinen Einfluss auf die weitere Entwicklung der Maus, so dass hier eventuell eine Bedeutung dieses Faktors kumulativ mit anderen Transkriptionsfaktoren angenommen werden kann. Mit dem Hinweis auf eine Kooperation mit anderen Faktoren oder einer Kompensation dieses Faktors durch einen anderen, wie es für Esx1 angenommen wird, ist eine Steuerung der Expression z.B. von Cx31, das ebenso wie Pem bevorzugt in extraembryonalen Geweben exprimiert wird, nicht ganz auszuschließen. Zudem drängt sich die Frage auf, welche Bedeutung die Expression von Pem dann noch für die extraembryonalen Gewebe während der Mausentwicklung und die männlichen und weiblichen Gonaden, in denen Pem ebenfalls bei der Maus exprimiert wird, hat. Fan et al., (1999) schlossen aus den Ergebnissen ihrer Versuche, in denen sie eine verstärkte Expression von Pem in embryonalen Stammzellen von Mausembryonen herbeiführten, dass verstärkt exprimiertes Pem eine blockierende Rolle für den Übergang undifferenzierter in differenzierte Zelllinien einnimmt. Über eine zeitlich schnellere oder überschießende Differenzierung während der Entwicklung bei Pem-defizienten Mäusen ist bisher noch nichts bekannt.

Die Literaturrecherche bezüglich GATA-3 – defizienten Mäuse, die anscheinend an einem Mangel an Noradrenalin im sympathischen Nervensystem an Tag 11pc sterben und dem Zusammenhang zu der Connexinexpression ergab, dass auch zwischen Connexinen und dem

sympathischem Nervensystem ein Zusammenhang besteht (Lim et al., 2000). So zeigte eine Untersuchung des Glucosestoffwechsels an Rattenlebern, dass ein verminderter Effekt von Noradrenalin auf den Glucosemetabolismus in einer regenerierenden Rattenleber weder auf eine geringere Produktion von Noradrenalin noch auf eine Depletion des Leberglycogens zurückzuführen ist, sondern wahrscheinlich durch eine Reduktion von gap junction, die die Signalübertragung von Nervenimpulsen in der Rattenleber assistieren, bedingt ist (Iwai et al., 1991). Somit ist hier ein möglicher Berührungspunkt zwischen GATA-3 und Connexinen gegeben, so dass eine Regulation der Connexine durch GATA-3 vorstellbar wäre. Bisher liegen allerdings noch keine dahingehenden weiterführenden Ergebnisse vor, so dass es sich um bisher nicht bewiesene Thesen handelt.

Im Gegensatz zu den anderen genannten Transkriptionsfaktoren, führt ein Fehlen des Transkriptionsfaktors GATA-6, der ebenfalls in der ICM und dem Trophektoderm exprimiert wird und nach der Implantation im parietalen Endoderm sowie im Mesoderm und im Endoderm, die an der Entwicklung des Herzens und des Darms beteiligt sind, zu finden ist, schon sehr viel früher zum Tod des Embryos. Der Tod tritt an Tag 5.5pc ein, also kurz nach der Implantation der Blastozyste. Wahrscheinlich ist der frühe Tod des Embryos durch einen Defekt im Epiblast, der einen Defekt im extraembryonalen Gewebe nach sich zieht, bedingt (Koutsourakis et al., 1999). Bisher wurden mögliche Zusammenhänge zwischen dem Zinkfingertranskriptionsfaktor GATA-6 und dem Cx43 noch nicht untersucht.

In der Postimplantationsphase kommt es bei der Connexinexpression sowohl der Maus, als auch der Ratte zu einer Kompartimentisierung von Cx31, 43 und 45. Diese scheint für die Abgrenzung der völlig verschiedenen Entwicklungsvorgänge des Embryos von denjenigen in den extraembryonalen Geweben wichtig zu sein, denn sie konnte von Lo und Gilula (1979) sowie von Kalimi und Lo (1989) auf der funktionellen Ebene nachgewiesen werden. Dabei wird die Expression von Cx31 in den Zellen, die der ICM entstammen, eingestellt und konzentriert sich auf die Gewebe, die dem Trophektoderm entstammen, sprich dem EPC und dem extraembryonalen Ektoderm (Dahl et al., 1996 a). Die Expression von Cx43 und Cx45 gestaltet sich komplementär zu der von Cx31. Diese beiden Connexine sind nach der Implantation nämlich nur noch im embryonalen Ektoderm und im viszeralem Endoderm vorhanden (Houghton et al., 2002). Eine besondere Aufmerksamkeit soll hier, im Vergleich zu den hier untersuchten Transkriptionsfaktoren, zunächst Cx31 und Cx43 gelten, da sie die einzigen Connexingene sind, die in der weiteren Entwicklung der Maus und auch der Ratte

exprimiert werden. Die anderen im Blastozystenstadium exprimierten Connexine werden nach der Implantation entweder nur sehr kurz und schwach oder gar nicht mehr exprimiert. Die Bildung der Plazenta beginnt bei der Maus an Tag 8.5pc. Als Vorbereitung für die eigentliche Plazenta bildet sich die Chorionplatte durch die Verschmelzung von Allantois und EPC aus. Ab Tag 10pc sind dann Plazentastrukturen erkennbar. Die Mausplazenta besteht aus folgenden Anteilen, der Labyrinthschicht, dem Spongiotrophoblasten und zur Dezidua hin abschließend einer Zone aus Trophoblastriesenzellen (GC).

Im postimplantativen Zeitraum der Mausentwicklung ergab die vorliegende Untersuchung des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters der vier untersuchten Transkriptionsfaktoren (GATA-2, GATA-3, PEM und Esx1) eher ein variables Bild. Ein „sorting out“, wie bei der Connexinexpression war hier nicht eindeutig feststellbar. Die Expression der mRNA war so in einigen extraembryonalen Zelllinien zunächst vorhanden, dann für einen gewissen Zeitraum nicht mehr nachweisbar und schließlich zu einem späteren Zeitpunkt erneut detektierbar. Im Folgenden werden die zu den einzelnen Transkriptionsfaktoren erzielten Ergebnisse von Stadium 5.5 bis 10.5dpc kurz rekapituliert und den schon in der Literatur bekannten Ergebnissen gegenübergestellt. Ebenso wird hier versucht die Transkriptionsfaktorexpressionsmuster mit den Mustern der Connexinexpression in Verbindung zu bringen oder eine mögliche Verbindung auszuschließen.

Bei den Transkriptionsfaktoren GATA-2 und GATA-3 gab es bisher keine veröffentlichten Analysen zum Expressionsmuster an Tag 5.5pc und 6.5pc. GATA-2 zeigte hierbei eine Expression in allen untersuchten Geweben, während GATA-3 nicht im embryonalen Ektoderm, ansonsten in allen anderen untersuchten Geweben, vertreten war. Bei GATA-2 und GATA-3 kam es im Stadium 6.5dpc zu einer Änderung des Expressionsmusters. Die mRNA-Expression von GATA-2 war hier nicht mehr im embryonalen Ektoderm und im parietalen Endoderm zu verzeichnen. GATA-3 wies nun eine Expression im embryonalen Ektoderm auf, die Expression im parietalen und viszeralen Endoderm war allerdings nun nicht mehr vorhanden. Zusätzlich zu den in der Literatur bekannten Expressionsmustern, gab es bei GATA-2 und GATA-3, weitere Gewebe, die hier ein positives Signal mit der nichtradioaktiven ISH zeigten. Zu den Ergebnissen von Ng et al. (1994), die mit der radioaktiven ISH erzielt wurden, zeigten sich zusätzlich zu der schon bekannten Expression in den GC, dem EPC, dem extraembryonalen Ektoderm und dem schwachen Signal in der Dezidua deutliche Signale im extraembryonalen Mesoderm, im parietalen Endoderm und außerdem eine starke Anfärbung in der Dezidua.

An Tag 7.5 hingegen war kein Signal im extraembryonalen Mesoderm zu sehen und auch die Expression im embryonalen Gewebe war in diesem Stadium nicht mehr vorhanden.

Die beiden Zinkfingertranskriptionsfaktoren wurden also sowohl in den Derivaten der ICM als auch des Trophektoderms exprimiert, wie es auch schon in der Präimplantationsphase der Fall war. Diese Tatsache weist darauf hin, dass eine Regulation von Cx31 und Cx43 durch die Zinkfingertranskriptionsfaktoren, wenn man eine mögliche Korrelation auf der Ebene der Expressionsmuster untersucht, eher unwahrscheinlich ist, da Cx31 und Cx43 im Gegensatz zu GATA-2 und GATA-3 unmittelbar postimplantativ ein „sorting out“ zeigen. Hierbei konzentriert sich Cx31 auf die Derivate des Trophektoderms und Cx43 auf die der ICM. Da die Transkriptionsfaktoren GATA-2 und GATA-3 neben anderen Geweben auch in denen exprimiert werden, in denen auch Cx31 und Cx43 vertreten sind, lässt sich eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Connexine allerdings nicht völlig ausschließen.

Wie schon zuvor zeigte GATA-2 an Tag 8.5pc, eine Expression im EPC im parietalen und weniger im viszeralen Anteil des Chorions. Die GC, sowie der parietale als auch der viszerale Dottersack und das embryonale Gewebe zeigten ebenfalls mit der nichtradioaktiven ISH ein deutliches Signal.

In Bezug auf das extraembryonale Gewebe war bisher nur eine Expression von mRNA mit Hilfe des Northern blot in der sich entwickelnden Plazenta festgestellt worden, wobei die mRNA offensichtlich aus der gesamten Plazenta isoliert wurde (Ng et al., 1994). Auch für GATA-3 fanden Ng et al., (1994) nur eine geringe Expression bei langer Exposition mit dem Northern blot. GATA-3 wies hier im Vergleich zum Vortag ein reduziertes, aber deutliches Expressionsmuster auf. Hier war nun nur noch eine Expression im parietalen Anteil der Chorionplatte zu erkennen. Der viszerale Anteil zeigte an einigen Stellen eine sehr geringe und an anderen Stellen keine Expression. In den GC sowie in der Dezidua war, wie auch im parietalen Anteil der Chorionplatte, ein mRNA-Signal zu sehen. Im Embryo selber zeigte sich im Gegensatz zu GATA-2 keine Expression. Untersuchungen mit GATA-2-defizienten Mäusen an 9.5 dpc und 10.5dpc zeigten, dass ein Verlust von GATA-2 zu Defekten in der Neurogenese führte (Nardelli et al., 1999). Ab Tag 9.5pc zeigten sowohl GATA-2 und GATA-3 eine Expression im Embryo, sowie im Dottersack, im Labyrinth, im Spongiotrophoblast und in den GCs. Untersuchungen von Silver und Palis (1997) ergaben, dass ab dem Stadium 8dpc die Hämatopoese im viszeralen Dottersack beginnt und GATA-2 neben 3 anderen Transkriptionsfaktoren an diesem Prozess beteiligt zu sein scheint. Andere Untersuchungen bezüglich der Expression und die Rolle von GATA-2 in den sekundären GCs

weisen auf eine Regulation von Trophoblastriesenzell-spezifischen Hormonen wie Prolaktin-like Protein A, plazentares Lactogen I und Proleferin hin (Ma und Linzer, 2000). Auch Cx43 wird wie GATA-2 im Spongiotrophoblasten, den GCs und dem Embryo exprimiert. Ebenso wie GATA-2 weist Cx43 eine Beteiligung an der Gehirnentwicklung auf und zeigt dort ebenfalls ein in einigen Punkten übereinstimmendes Expressionsmuster zu GATA-2 (Ruangvoravat and Lo, 1992). Wie auch schon oben beschrieben spielt Cx43 eine Rolle bei der Hämatopoese wie Untersuchungen mit Cx43-defizienten Mäusen zeigten (Montecino-Rodriguez et al., 2000). Alle diese Übereinstimmungen in Hinblick auf das ähnliche Expressionsmuster und das ähnliche Aufgabengebiet von GATA-2 und Cx43 könnte eine Regulation von Cx43 durch GATA-2 vermuten lassen.

GATA-3 zeigte an Tag 10.5pc eine fehlende Expression im viszeralen und parietalen Dottersack. Für GATA-3 lässt sich wie an Tag 9.5pc sagen, dass es lediglich Untersuchungen mit Northern Blot-Analysen gibt, die eine Expression in der Plazenta nachweisen, wobei nicht näher bezeichnet wurde, aus welchem Teil der Plazenta die mRNA gewonnen wurde (Ng et al., 1994). Einen Berührungspunkt zu Cx43 gibt es zum einen auf der Ebene der Expression im Spongiotrophoblasten und in den GC, sowie in den embryonalen Anteilen und zum anderen bei der Hämatopoese. Manaia et al. (2000) zeigten eine Beteiligung von GATA-3 an der Spezifikation von intraembryonalen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Untersuchungen von Montecino-Rodriguez et al. (2000) zeigten eine entscheidende Rolle von Cx43 bei der Hämatopoese auf. Sowohl Cx43 als auch GATA-3 sind demnach an der Blutbildung beteiligt, so dass es die Vermutung zulässt, dass GATA-3 an der Regulation von Cx43 während der Hämatopoese sowie an den Regulationsprozessen in den extraembryonalen Geweben beteiligt sein könnte.

Bei dem Transkriptionsfaktor Pem, konzentrierte sich die Expression an Tag 5.5pc zunächst auf die Zelllinien, die dem Trophektoderm entstammen. Die Unterschiede zwischen den hier vorliegenden Ergebnissen, die mit der nichtradioaktiven ISH erzielt wurden, und den immunhistochemischen Untersuchungen von Lin et al. (1994), tauchten schon kurz nach der Implantation, in den Stadien 5.5pc und 6.5pc auf. Das Protein Pem, das laut Lin et al. (1994) exklusiv im extraembryonalen Gewebe exprimiert wird, wurde hier an Tag 6.5pc als mRNA auch im embryonalen Ektoderm und dem extraembryonalen Mesoderm exprimiert. Lin et al. (1994) detektierten das Pemprotein auch im Stadien 5.5 und 6.5 dpc im viszeralen Endoderm, hier zeigten die Untersuchungen auf mRNA ein negatives Ergebnis. An beiden Tagen war hier in den GC eine deutliche Expression in Bezug auf die mRNA zu verzeichnen, während sie keine Proteinexpression in den GC nachweisen konnte. Hierbei scheint es so zu sein, dass

mRNA und Proteinexpression nicht am selben Tag aufeinander folgen, sondern um ein bis zwei Tage versetzt stattfindet, denn Lin et al. (1994) detektierten an Tag 7.5pc Pem-Protein in einzelnen GCs. Neben dem Signal in den GCs konnten sie auch eine Expression von mRNA mit Hilfe der radioaktiven ISH im viszeralem Endoderm, dem Chorion und dem EPC nachweisen. Die nichtradioaktive ISH erzeugte ein sehr starkes mRNA-Signal in der Dezidua, wohingegen die Arbeitsgruppe Lin et al. (1994) weder ein mRNA-Signal mit der ISH noch das Protein mit der Immunhistochemie in der Dezidua detektieren konnten. Die Ergebnisse müssen also aufgrund der genannten Differenzen im Vergleich zwischen Protein- und mRNA-Expression, aber auch im Vergleich des mRNA-Signals in der radioaktiven bzw. nichtradioaktiven ISH kritisch betrachtet werden.

Da es sich um verschiedene Methoden von mRNA-Detektion handelt, nämlich einmal die hier verwendete nichtradioaktive ISH und die radioaktive ISH von der Arbeitsgruppe um Lin (1994), könnten die unterschiedlichen Ergebnisse daher rühren. Hierbei scheint die nichtradioaktive ISH sensibler zu sein als die radioaktive, da mit dieser an Tag 7.5dpc zusätzlich zu der Expression im EPC, den sekundären GC und dem viszeralem Endoderm, eine Expression im extraembryonalen Ektoderm sowie Mesoderm detektiert werden konnte. Kreuzreaktionen sind eher unwahrscheinlich, da die Kontrollen jeweils keine Signale aufwiesen. Es ließ sich auch nicht eruieren, ob es sich auch hier um eine verzögerte Proteinexpression im extraembryonalen Ektoderm und dem Mesoderm handeln könnte, da keine Ergebnisse über die Proteinexpression in diesen beiden Geweben in der Literatur bekannt gegeben sind.

Pem ist als regulierende Instanz für Cx43 auszuschließen, da hier direkt nach der Implantation an Tag 5.5pc dieses in dem extraembryonalen Gewebe reprimiert wird. Das Muster von Pem entspricht so eher dem postimplantativen Verhalten von Cx31, das sich ebenfalls auf die extraembryonalen Gewebe beschränkt. Wie von Dahl et al., (1996 b) gezeigt, ist sowohl die mRNA, als auch das Protein von Cx31 im EPC und im extraembryonalen Ektoderm vorhanden. Mögliche Bindungsstellen für Pem im Cx31-Gen sind bisher weder im Cx31-Gen der Maus noch der Ratte bekannt (Plum, persönliche Kommunikation; Gabriel et al., 2001). Betrachtet man allerdings die Untersuchungen der Cx31- und Pem-defizienten Mäuse unter dem Gesichtspunkt, dass eine Pem-defiziente Maus im Gegensatz zu Cx31-defizienten Mäusen keine sichtbaren Defekte aufweist, wird eine Regulation des Cx31-Gens zumindest alleine durch den Transkriptionsfaktor Pem unwahrscheinlich. Es ist jedoch eine Kompensation des fehlenden Pems durch andere Transkriptionsfaktoren, wie sie z.B. für Esx1

diskutiert wird, denkbar und lässt so keinen endgültigen Ausschluss von Pem als regulierende Instanz von Connexinen während der Entwicklung der Maus zu.

In den Stadien 8.5 bis 10.5dpc zeigte Pem im Vergleich zu GATA-2 ein sehr ähnliches Expressionsmuster. Lediglich die Expression im Embryo war bei Pem nicht vorhanden. Allerdings ließen sich hier, wie auch schon in den vorherigen Entwicklungsstadien der Maus, Unterschiede zu den aus der Literatur bekannten Ergebnissen aufzeigen. Es ließ sich hier im viszeralen Dottersack eine deutliche Expression im mesodermalen Anteil und eine wesentlich schwächere Expression im endodermalen Anteil erkennen. Der parietale Dottersack zeigte ebenfalls ein Signal. Ebenso ließ sich im Amnion eine deutliche Reaktion erkennen, während Lin et al. (1994) hier keine Expression nachweisen konnten. Lin et al. (1994) zeigten eine mRNA-Expression im Chorion, im EPC, im distalen Anteil des viszeralen Dottersacks und in den GC auf. Die Expression des Transkriptionsfaktors Pem veränderte sich an Tag 10.5pc im Vergleich zum Vortag nicht. Die Expression war weiterhin im Spongiotrophoblasten, dem Labyrinth und den GC, sowie der Chorionplatte zu verzeichnen. Pitman et al. (1998), die dieses Stadium der Mausentwicklung mit der nichtradioaktiven ISH untersuchten, zeigten ebenfalls eine Expression in der gesamten Plazenta und der Chorionplatte sowie dem Endoderm des viszeralen Dottersacks, in dem in den hier vorliegenden Ergebnissen keine Expression zu verzeichnen war. Eine Expression im Amnion, die hier gezeigt werden konnte, konnte wiederum von Pitman et al. (1998) nicht nachgewiesen werden. In den Stadien der Plazentaentwicklung wird Cx31 nur in den GC und dem Spongiotrophoblasten exprimiert. Pem zeigte hier nicht ein solches Expressionsmuster, das zu dem von Cx31 identisch gewesen wäre. Die Expression von Pem erstreckt sich über mehr Gewebe als die von Cx31. Eine Regulation von Cx43 durch c-fos und c-jun, deren Expression auch nicht in allen Punkten mit der von Cx43 übereinstimmt, ist von Mitchell und Lye (2001) nachgewiesen, so dass ein zu hundert Prozent übereinstimmendes Expressionsmuster nicht zwingend ist, um eine Regulation von Cx31 durch Pem annehmen zu können.

Esx1 zeigte an Tag 5.5dpc, als auch an Tag 6.5pc eine ubiquitäre Expression sowohl in den embryonalen, als auch den extraembryonalen Geweben, d.h. im EPC, im extraembryonalen Ektoderm, im extraembryonalen Mesoderm, in den GC, im parietalen Endoderm, im viszeralen Endoderm, im embryonalen Ektoderm und auch in der Dezidua. Für diese beiden Tage gab es, wie auch für das Blastozystenstadium noch keine Ergebnisse, die in der Literatur veröffentlicht wurden. In den Stadien 7.5 und 8.5dpc konnte über Esx1 aufgrund einer Kreuzreaktion keine Aussage gemacht werden. Yan et al. (2000) zeigten an Tag 7.5pc mit Hilfe der nichtradioaktiven ISH an Kryoschnitten nur eine Expression im Ektoderm des

Chorion, sonst in keinem anderen extraembryonalen Gewebe. An Tag 8.5pc fanden Yan et al. (2000) eine Expression im EPC. Li et al. (1997) wiesen sowohl mit der nichtradioaktiven ISH, als auch mit dem Northern Blot an Tag 8.5pc ebenfalls eine Expression im Ektoderm des Chorion und in der proximalen Basis des EPCs nach. Im Stadium 9.5dpc ließ sich die mRNA-Expression von Esx1 wieder beurteilen. Es zeigte sich mit der nichtradioaktiven ISH eine mRNA-Expression sowohl im Labyrinth, als auch im Spongiotrophoblasten. Ebenfalls wurde ein Signal in den GC sichtbar. Der viszerale und der parietale Dottersack zeigten eine Färbung, wobei das Signal im parietalen Anteil stärker imponierte. Hier gab es im Vergleich zu den in der Literatur geschilderten Expressionsmustern Differenzen. Zum Stadium 9.5dpc wurde von Li et al. (1997) eine Expression im Labyrinth und den GC gefunden. Auch der viszerale Dottersack wies ein Signal auf, wobei es sich auf den endodermalen Anteil des Dottersacks beschränkte. Auch Yan et al. (2000) fanden eine Expression im Labyrinth. Da hier eine Differenz besonders zu der in der Literatur erwähnten Expression in der Plazenta bestand, müssen diese Ergebnisse kritisch betrachtet werden. Schon in den Stadien 7.5dpc und 8.5dpc war eine Kreuzreaktion vorhanden, so dass es sich hier um eben eine solche handeln könnte, obwohl die Kontrollen in diesen Stadien keine Signale aufwiesen. Für Esx1 lässt sich in Bezug zur Literatur keine Änderung zum Vortag erkennen. Die Expression im Spongiotrophoblasten war nach wie vor nur in der hier gezeigten Untersuchung zu verzeichnen.

Eine Übereinstimmung mit dem untersuchten Transkriptionsfaktor Esx1 zeigte im weitesten Sinne Cx43, das nach Untersuchungen sowohl im embryonalen Ektoderm, als auch im viszeralen Endoderm exprimiert wird (Dahl et al, 1996 b). Esx1 wird allerdings als ein Marker für das extraembryonale Gewebe propagiert, was es eher unwahrscheinlich erscheinen lässt, dass er für die Regulation des Cx43-Expressionsmusters verantwortlich ist.

Auch Cx31 war wie Esx1 im extraembryonalen Ektoderm und im EPC zu detektieren. Allerdings beschränkte sich die Expression nicht wie bei Cx31 auf diese beiden extraembryonalen Gewebe, sondern ist auch wie oben beschrieben in anderen Geweben vorhanden. Gleiches trifft auch auf die Expression in der Plazenta zu. Dort findet man Cx31 in den GC und dem Spongiotrophoblasten, während Esx1 zusätzlich nach den hier vorliegenden Ergebnissen im Labyrinth mit seiner mRNA vertreten war. Das Expressionsmuster von Cx31 stimmt also nur in einigen Punkten mit dem Muster des untersuchten Transkriptionsfaktors Esx1 überein. Was allerdings nach der oben erwähnten veröffentlichten Analyse von Mitchell und Lye (2001) nicht ausschließt, dass Cx31 durch Esx1 reguliert werden könnte.

Setzt man die Ergebnisse von Li und Yan voraus, so kann man eine Korrelation mit Cx26, das zum Zeitpunkt der Plazentaentwicklung ausschließlich im Labyrinth exprimiert wird, sehen. Die hier erzielten Ergebnisse weisen aber eher darauf hin, dass dies nicht der Fall ist. Eine Aussage, ob die exprimierten Connexine von den ebenfalls in der Blastozyste und in der postimplantativen Entwicklung exprimierten und hier untersuchten Transkriptionsfaktoren beeinflusst oder sogar gesteuert werden, ist alleine mit der nichtradioaktiven ISH nicht möglich. Somit wäre es beispielsweise interessant ein Augenmerk auf eine veränderte Expression von Connexinen bei Transkriptionsfaktor-defizienten Mäusen zu legen und umgekehrt auch noch eine Veränderung der Transkriptionsfaktorexpression in Connexin-defizienten Mäusen, während der Prä- und Postimplantationsphase zu untersuchen, um eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der Connexinexpression und der Expression der Transkriptionsfaktoren zu erkennen. Ebenso könnte eine Kotransfektion entsprechender Expressionsvektoren ausgewählter Transkriptionsfaktoren und Connexinen in Zelllinien hilfreich sein, eine engere Auswahl in Frage kommender Transkriptionsfaktoren zu treffen. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Erzeugung von KO- sowie Doppel-KO-Mäusen, z.B. Doppel-KO-Mäuse von einem Connexin und im günstigsten Fall mehrerer Transkriptionsfaktoren. Durch all diese weiterführenden Untersuchungen könnte eventuell eine weitere Eingrenzung oder sogar eine Entdeckung von Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise an der Regulation von Differenzierungsprozessen, die während der Trophoblastentwicklung und der Plazentaentwicklung stattfinden, erreicht werden. Die Regulation der Connexinexpression und auch die Regulation der Connexine zu verstehen, ist Voraussetzung für das Verstehen des Auftretens und der Ausprägung von Erkrankungen oder auch gestörter Entwicklungsabläufe, die aufgrund einer veränderten Connexinexpression oder Funktion der Connexine postnatal letal enden oder zur Ausprägung einer Organdysfunktion führen.

5 Zusammenfassung

Bei vielen Säugetieren sind von der befruchteten Eizelle bis zum lebensfähigen Organismus Differenzierungsschritte notwendig. Hierbei müssen sich u. a. die extraembryonalen Gewebe bis zur funktionstüchtigen Plazenta differenzieren, um dem Lebewesen die Ernährung und somit auch die Differenzierung zu ermöglichen. Einen wesentlichen Anteil an diesen Differenzierungsvorgängen sowohl der extraembryonalen als auch der embryonalen Gewebe haben die Connexine. Bisher ist nur wenig darüber bekannt, welchen Regulationsmechanismen die Connexine unterliegen. So ist z.B. die durch zellspezifische Transkriptionsfaktoren mögliche Regulation des „sorting out“ der Connexine zu Beginn der Postimplantationsphase nicht geklärt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zur Herausarbeitung einer möglichen Korrelation die Expressionsmuster der Connexine 31 und 43 mit denen der Transkriptionsfaktoren GATA-2, GATA-3, Esx1 und Pem mittels der nichtradioaktiven in situ Hybridisierung vom Blastozystenstadium bis zum Tag 10.5pc am Beispiel der Maus verglichen.

Im Blastozystenstadium wurde die mRNA der Transkriptionsfaktoren und ebenso die der Connexine übereinstimmend im Trophektoderm und in der inneren Zellmasse exprimiert. In der Postimplantationsphase beschränkte sich die Expression von Cx31 auf die Derivate des Trophektoderms, die von Cx43 auf die von der inneren Zellmasse abstammenden Gewebe. Keiner der hier untersuchten Transkriptionsfaktoren zeigte so deutlich ein „sorting out“ wie Cx31 und Cx43. Eine Korrelation zeigte sich bei ähnlichem Expressionsmuster für GATA-2 sowie GATA-3 und Cx43. In Anbetracht einer in der Literatur dargestellten gemeinsamen Funktion bei der Neurogenese als auch Hämatopoese kann eine Regulation von Cx43 durch GATA-2 und/ oder GATA-3 nicht ausgeschlossen werden. Auszuschließen ist hingegen eine Regulation von Cx43 durch Pem, da sich die Expression von Pem ausschließlich in den Derivaten des Trophektoderms nachweisen lässt. Eine Regulation von Cx31 durch Pem ist unter Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren, z.B. Esx 1 vorstellbar. Aufgrund einer bei den Untersuchungen von Esx1 aufgetretenen Kreuzreaktion lässt sich hierzu keine sichere Aussage machen. Zusammenfassend zeigt die Arbeit, dass sich lediglich Pem als regulierender Transkriptionsfaktor für Cx43 ausschließen lässt. Eine Beteiligung der anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren an der Regulation der hier betrachteten Connexine lässt sich nur vermuten. Hier wären also noch weiterführende Untersuchungen wie z.B. Kotransfektion von Transkriptionsfaktoren und Connexinen oder auch die Untersuchung der Expressionsmuster an verschiedenen gendefizienten Mäusen notwendig.

6 Literatur

Alves, L.A., Nihei, O.K., Fonseca, P.C., Campos-de- Carvalho, A.C., Savino, W. (2000): Gap junction modulation by extracellular signaling molecules: the thymus model.

Braz. J. Med. Biol. Res., 33(4), 457-465

Atchley, W.R., Fitch, W.M. (1997): A natural classification of the basic helix-loop-helix class transcription factors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5172-5176

Beyer, E.C., Paul, D.L., Goodenough, D.A. (1990): Connexin family of gap junction proteins.

J. Membrane Biol. 116, 187-194

Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E., Palmiter, R.D. (1988): Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 836-840

Brissette, J.L., Kumar, N.M., Gilula, N.B., Dotto, G.P. (1991): The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins.

Mol. Cell. Biol. 11 (10), 5364-5371

Cross, J.C., Werb, Z., Fisher, S. J. (1994): Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle.

Science 266, 1508-1518

Cross, J.C. (2001): Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis.

Cell and developmental biology 11, 105-113

Dahl, E., Manthey, D., Chen, Y., Schwarz, H.-J., Chang, Y.S., Lalley, P.A., Nicholson, B.J., Willecke, K. (1996a): Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin.
J. Biol. Chem. 271, 17903-17910

Dahl, E., Winterhager, E., Reuss, B., Traub, O., Butterweck, A., Willecke, K. (1996b): Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively.
J. Cell Sci. 109, 191-197

Davies, T.C., Barr, K.J., Jones, D.H., Zhu, D., Kidder, G.M. (1996): Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse.
Dev Genet 18 (3), 234-243

Dermietzel, R., Traub, O., Hwang, T.K., Beyer, E., Bennet, M.V., Spray, D.C., Willecke, K. (1989): Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 86 (24), 10148-10152

Dermietzel, R. (1993): The gap junction channel
Exs. 66, 109-117 review

Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hülser, D.F., Willecke, K. (1995): Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells.
J. Cell Biol. 129, 805-817

Fan, Y., Melhem, M.F., Chaillet, J.R. (1999): Forced expression of the Homeobox-containing gene Pcm blocks differentiation of embryonic stem cells.
Dev. Biol. 15, 481-496

Flagg-Newton, J.L., Dahl, G., Loewenstein, W.R. (1981): Cell function and cyclic AMP: 1. Upregulation of junctional membrane permeability and junctional membrane particles by administration of cyclic nucleotide or phosphodiesterase inhibitor. *Journal of membrane biology* 63, 105-121

Gabriel, H.-D., Jung, D., Bützler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E., Willecke K. (1998): Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.* 140, 1453-1461.

Gabriel, H., Ströbl, B., Hellmann, P., Buettner R., Winterhager, E. (2001): Organization and regulation of the rat Cx31 gene. Implication for a crucial role of the intron region *Eur. J. Biochem.* 268, 1749-1759

Goomer, R.S., Holst, B.D., Wood, I.C., Jones, F.S., Edelman, G.M. (1994): Regulation in vitro of an L-CAM enhancer by homeobox genes HoxD9 and HNF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (17), 7985-7989

Grümmer, R., Reuss, B., Winterhager, E. (1996 a): Expression pattern of different gap junction connexins is related to embryo implantation. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 361-367.

Grümmer, R., Hellmann, P., Traub, O., Soares, M.J., El-Sabban, M.E., Winterhager, E. (1996 b): Regulation of Connexin31 gene expression upon retinoic acid treatment in rat choriocarcinoma cells. *Experimentell cell research* 227, 23-32

Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J. Kpymer, A.L. (1994): Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* 371, 333-336

Hollenberg, S.M., Sternglanz, R., Cheng, P.F., Weintraub, H. (1995): Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell Biol.* 15, 3813-3822

Houghton, F.D., Barr, K.J., Traub, O., Leese, H.J., Gabriel, H.-D., Walter, G., Grümmer, R., Winterhager, E., Kidder, G.M. (2002): Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development.
Biol. Reprod. 66 (5), 403-412

Iwai, M., Miyashita, T., Shimazu, T. (1991): Inhibition of glucose production during hepatic nerve stimulation in regenerating rat liver perfused in situ. Possible involvement of gap junctions in the action of sympathetic nerves.
Eur. J. Biochem. 200 (1): 69-74

Johnson, J.E., Birren, S.J., Saito, T., Anderson, D.J. (1992): DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (Mash) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3596-3600

Kalimi, G.H. and Lo, C.W. (1998): Gap junctional communication in the extraembryonic tissues of the gastrulating mouse embryo.
J. Cell Biol. 109, 3015-3026

Kirchhoff, S., Nelles, E., Hagendorff, A., Krüger, O., Traub, O., Willecke, K. (1998): Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice.
Curr. Biol. 8, 299-302

Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R., Grosveld, F. (1999): The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development.
Development 126 (4), 723-732

Krüger, O., Plum, A., Kim, J.-S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W.H., Willecke, K. (2000): Defective vascular development in connexin45-deficient mice.
Development 127, 4179-4193

Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., Shibata, Y. (2000): Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 127, 3501-3512

Lau, A.F., Kurata, W.E., Kanemitsu, M.Y., Loo, L.W., Warn-Cramer, B.J., Eckhart, W., Lampe, P.D. (1996): Regulation of Connexin 43 function by activated tyrosine protein kinases. *J. Bionerg. Biomembr.* 28 (4), 359-368

Laverriere, A.C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R.E., Burch, J.B., Evans, T. (1994): GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* 269, 23177-23184

Lefebvre, D.L., Piersanti, M., Bai, X.-H., Chen, Z.-Q., Lye, S.J. (1995): Myometrial transcriptional regulation of the gap junction gene, connexin-43. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 603-611

Li, Y., Lemaire, P., Behringer, R.R. (1997): Esx1, a novel X chromosome-linked homeobox gene expressed in mouse extraembryonic tissues and male germ cells. *Dev. Biol.* 188, 85-95

Li, Y., Behringer, R.R. (1998): Esx1 is an X-Chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nat. genet.* 20 (3), 309-311

Lin, T.P., Labosky, P.A., Grabel, L.B., Kozak, C.A., Pitman, J.L., Kleeman, J., MacLeod, C.L. (1994): The Pem homeobox gene is X-linked and exclusively expressed in extraembryonic tissues during early murine development. *Dev. Biol.* 166 (1), 170-179

- Lim, K.C., Lakshmanan, G., Crawford, S.E., Gu, Y., Grosveld, F., Engel, J.D. (2000): GATA-3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system.
Nature genetics 25 (2), 209-212
- Lo, C.W. and Gilula, N.B. (1979): Gap junctional communication in the postimplantation mouse embryo.
Cell 18, 411-422
- Ma, G.T., Roth, M.E., Groskopf, J.C., Tsai, F.-Y., Orkin, S.H., Grosveld, F., Engel, J.D., Linzer, D.I.H. (1997): GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo.
Development 124, 907-914
- Ma, G.T., Linzer, D.I. (2000): GATA-2 restricts prolactin-like protein an expression to secondary trophoblast giant cells in the mouse.
Biol. Reprod. 63 (2), 570-574
- MacLeod, C.L., Fong, A.M., Seal, B.S., Walls, L., Wilkinson, M.F. (1990a): Isolation of novel complementary DNA clones from T lymphoma cells: One encodes a putative membrane-spanning protein.
Cell Growth Differ. 1, 271-279
- Maiti, S., Daskow, J., Sutton, K., Nhim, R.P., Lawlor, D.A., Levan, K., Lindsey, J.S., Wilkinson, M.F. (1996): The Pem homeobox gene: rapid evolution of the homeodomain, X-chromosomal localization and expression in reproductive tissue.
Genomics 34, 304-316
- Makowski, L., Caspar, D.L., Phillips, W.C., Goodenough, D.A. (1977): Gap junction structure. II. analysis of the x-ray diffraction data.
J. Cell Biol. 74, 629-645

Manaia, A., Lemarchandel, V., Klaine, M., Max-Audit, I., Romeo, P., Dieterlen-Lievre, F., Godin, I. (2000): Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites.

Development 127 (3), 643-653

Manthey, D., Bukauskas, F., Lee, C.G., Kozak, C.A., Willecke, K. (1999): Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells.

J. Biol. Chem, 274, 14716-14723

Massas, R., Korenstein, R., Benayahu, D. (1998): Estrogen modulation of osteoblastic cell-to-cell communication.

Journal of cellular biochemistry, 69, 282-290

Mitchell, J.A., Lye, S.J. (2001): Regulation of connexin43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells.

Cell Adhes. Commun. 8 (4-6), 299-302

Mitchell, J.A., Ou, C., Chen, Z., Nishimura, T., Lye, S.J. (2001): Parathyroid hormone-induced up-regulation of connexin-43 messenger ribonucleic acid (mRNA) is mediated by sequences within both the promoter and the 3' untranslated region of the mRNA.

Endocrinology 142 (2), 907-15

Molkentin, J.D. (2000): The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6 ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression.

J. Biol. Chem. 275, 38949-38952

Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., Dorshkind, K. (2000): Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis.

Blood 96 (3), 917-924

Müntener, M., Hsu, Y.-C. (1977): Development of trophoblast and placenta of the mouse: A reinvestigation with regard to the in vitro culture of mouse trophoblast and placenta.

Acta Anat. 98, 241-252

Muller, H., Ishimura, R., Orwig, K.E., Liu, B., Soares, M.J. (1998): Homologues for prolactin-like proteins A and B are present in the mouse.

Biol. Reprod. 58 (1), 45-51

Musil, L.S., Cunningham, B.A., Edelmann, G.M., Goodenough, D.A. (1990): Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin 43 communication-competent and deficient cell lines.

J. Cell Biol. 111 (5), 2077-2088

Nakayama, H., Liu, Y., Stifani, S., Cross J.C. (1997): Developmental restriction of Mash-2 expression in trophoblast correlates with potential activation of the notch-2 pathway.

Dev. Genet. 21, 21-30

Nardelli, J., Thiesson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F.-Y., Orkin, S.H. (1999): Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system.

Dev. Biol. 210, 305-321

Neuhaus, I.M., Bone, L., Wang, S., Ionasescu, V., Werner, R. (1996): The human connexin32 gene is transcribed from two tissue-specific promoters.

Biosci. Rep. 16, 239-248

Ng, Y.-K., George, K.M., Engel, J.D., Linzer, D.I.H. (1994): GATA factor activity is required for the trophoblast-specific transcriptional regulation of the mouse placental lactogen I gene.

Development 120, 3257-3266

Nicholson, B., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K., Revel, J.-P. (1987): Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature* 329, 732-734

Nicholson, B.J. und Zhang, J.T. (1988): Multiple protein components in a single gap junction. *Modern Cell Biology, Vol. 7 Gap Junctions*. Hrsg.: E.L. Hertzberg und R.G. Johnson. Alan R. Liss, Inc., New York, 207-218

O'Brien, J., Al-Ubaidi, M.R., Ripps, H. (1996): Connexin 35: A gap junction protein expressed preferentially in the skate retina *Molecular Biology of the cell* 7, 233-243

Omichinski, J.G., Trainor, C., Evans, T., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., Felsenfeld, G. (1993): A small single-“finger” peptide from the erythroid transcription factor GATA-1 binds specifically to DNA as a zinc or iron complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1676-1680

Pauken, C. M., Lo, C. W., (1995): Nonoverlapping expression of Cx43 and Cx26 in the mouse placenta and decidua: a pattern of gap junction gene expression differing from that in the rat. *Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia 19104-6017, USA*

Petrocelli, T., Lye, S.J. (1993): Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin 43. by estrogen and progesterone. *Endocrinology* 133, 284-290

Pitman, J.L., Lin, T.P., Kleeman, J.E., Erickson, G.F., MacLeod, C.L. (1998): Normal reproductive and macrophage function in *Pem* homeobox gene-deficient mice. *Dev. Biol.* 202 (2), 196-214

Plum, A., Winterhager, E., Posch, J., Lautermann, J., Hallas, G., Rosentreter, B., Traub, O., Heberhold, C., Willecke, K., (2001): Cx31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Developmental biology* 231, 334-347

Reaume, A.G., DeSousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., Rossant, J. (1995): Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1834

Redline, R.W., Chernicky, C.L., Tan, H.Q., Ilan, J., Ilan J. (1993): Differential expression of insulin-like growth factor-II in specific regions of the late (post day 9.5) murine placenta. *Mol. Reprod. Dev.* 36 (2), 121-129

Reuss, B., Hellmann, P., Dahl, E., Traub, O., Butterweck, A., Grümmer, R., Winterhager, E., (1996): Connexins and E-cadherin are differentially expressed during trophoblast invasion and placenta differentiation in the rat. *Dev. Dyn.* 205, 172-182

Riley, P., Anson-Cartwright, L., Cross, J.C. (1998): The Hand1 helix-loop-helix transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* 18, 271-275

Rinkenberger, J., Cross, J.C., Werb, Z. (1997): Molecular genetics of implantation in the mouse. *Developmental genetics* 21, 6-20

Risek, B. and Gilula, N.B. (1991): Spatiotemporal expression of three gap junction gene products involved in fetomaternal communication during rat pregnancy. *Development* 113, 165-181

Romaniuk, P.J. (1985): Characterization of the RNA binding properties of transcription factor IIIa of *Xenopus laevis* oocytes.

Nucleic Acids. Res. 13, 5369-5387

Rosen, B. and Beddington, R.S. (1993): Whole mount in situ hybridization in the mouse embryo: gene expression in three dimensions.

Trends in Genetics 9, 162-167

Rosenberg, E., Faris, R.A., Spray, D.C., Monfils, B., Abreu, S., Danishefsky, I., Reid, L.M. (1996): Correlation of expression of connexin mRNA isoforms with degree of cellular differentiation.

Cell. Adhes. Commun. 4 (4-5), 223-235

Rossant, J., Guillemot, F., Tanaka, M., Latham, M., Gertenstein, M., Nagy, A. (1998): Mash-2 is expressed in oogenesis and preimplantation development but is not required for blastocyst formation.

Mech. Dev. 73, 183-191

Ruangvoravat, C.P. and Lo, C.W. (1992): Connexin43 expression in the mouse embryo: localization of transcripts within developmentally significant domains.

Dev. Dyn. 194 (4), 261-281

Rugh, R. (1990): The mouse, its reproduction and development.

Oxford University Press, Oxford

Sáez, J.C., Berthoud, V.M., Kadle, R., Traub, O., Nicholson, B.J., Bennett, M.V., Dermietzel, R. (1991): Pinealocytes in rats: connexin identification and increase in coupling caused by norepinephrine

Brain research 24, 265-275

Sáez, J.C., Martinez, A.D., Branes, M.C., Gonzalez, H.E. (1998): Regulation of gap junctions by protein phosphorylation.

Braz. J. med. Biol. Res. 31 (5), 593-600

- Schöler, H.R. (1991): Octamania: the POU factors in murine development.
Trends Genet. 7, 323-329
- Seul, K.H., Tadros, P.N., Beyer, E.C. (1997): Mouse connexin 40: gene structure and promotor analysis.
Genomics 46, 120-126
- Shin, B.C., Suzuki, T., Matsuzaki, T., Tanaka, S., Kuraoka, A., Shibata, Y., Takata, K. (1996): Immunolocalization of GLUT1 and connexin 26 in the rat placenta.
Cell Tissue Res. 285 (1), 83-89
- Silver, L., Palis, J. (1997): Initiation of embryonic erythropoiesis: a spatial analysis.
Blood 89 (4), 1154-1164
- Simon, A.M., Goodenough, D.A., Paul, D.L. (1998): Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block.
Curr. Biol. 8, 295-298
- Simon, M.C. (1995): Gotta have GATA.
Nat. Genet. 11, 9-11
- Sohl, G., Gillen, C., Bosse, F., Gleichmann, M., Muller, H.W., Willecke, K. (1996): A second alternative transcript of the gap junction gene connexon32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve.
Eur. J. Cell Biol. 69, 267-275
- Srinivas, M., Rozental, R., Kojima, T., Dermietzel, R., Mehler, M., Condorelli, D.F., Kessler, J.A., Spray, D.C. (1999): Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction connexin36.
J. Neurosci. 19, 9848-9855

Suadecani, S. O., Vink, M. J., Spray, D.C., (2000): Slow intercellular Ca²⁺ signaling in wild-type and Cx43-null neonatal mouse cardiac myocytes.

Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279 (6), H 3076-88

Sutton, K.A. and Wilkinson, M.F. (1997): Rapid evolution of a homeodomain: evidence for positive selection.

J. Mol. Evol. 45 (6), 579-588

Swenson, K.I., Piwnica-Worms, H., McNamee, H., Paul, D.L. (1990): Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication.

Cell Regul. 1 (13), 989-1002

Tanaka, M., Gertsenstein, M., Rossant, J., Nagy, A. (1997): Mash2 acts cell autonomously in mouse Spongiotrophoblast development.

Dev. Biol. 190, 55-65

Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O., Hirano, H. (1994):

Immunolocalization of glucose transporter GLUT1 in the rat placental barrier: possible role of GLUT1 and the gap junction in the transport of glucose across the placental barrier.

Cell Tissue Res. 276 (3), 411-418

Ting, C.N., Olson, M.C., Barton, K.P., Leiden, J.M. (1996): Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage.

Nature 384,474-478

Trosko, J.E., Madhukar, B.V., Chang, C.C. (1993): Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: toxicological and pharmacological implications.

Life Sci. 53 (1), 1-19

Tsai, F.-Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., Orkin, S.H. (1994): An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2.

Nature 371, 221-226

Tu, Z.J., Kiang, D.T. (1998): Mapping and characterization of the basal promotor of the human connexin26 gene.

Biochemica et Biophysica Acta 1443, 169-181

Valarché, I., Tissier-Seta, J.P., Hirsch, M.R., Martinez, S., Goridis, C., Brunet, J.F. (1993): The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promotor activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype.

Development 119 (3), 881-896

Vance, M.M. and Wiley, L.M. (1999): Gap junction intercellular communication mediates the competitiv cell proliferation disadvantage of irradiated mouse preimplantation embryos in aggregation chimeras.

Radiat. Res. 152 (2), 544-551

Veenstra, R.D. (1996): Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins.

J. Bioenerg. Biomemb. 28, 327-337

Visvader, J.E., Crossley, M., Hill, J., Orkin, S.H., Adams, J.M. (1995): The C-terminal zinc finger of GATA-1 or GATA-2 is sufficient to induce megakaryocytic differentiation of an early myeloid cell line.

Mol. Cell. Biol. 15, 634-641

Voronova, A., Baltimore, D. (1990): Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4722-4726

Warn-Cramer, B.J., Lampe, P.D., Kurata, W.E., Kanemitsu, M.Y., Loo, L.W., Eckhart, W., Lau, A.F. (1996): Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein.
J. Biol. Chem. 271 (7), 3779-3786

Webb, D.K., Moultop, B.C., Khan, S.A. (1990): Estrogen induced expression of the c-jun proto-oncogene in the immature and mature rat uterus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 724-6

Weisz, A., Bresciani, F. (1988): Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus.
Mol. Endocrinol. 2, 816-24

Wilkinson, M.F., Kleemann, J., Richards, J., MacLeod, C.L. (1990): A novel oncofetal gene is expressed in a stage-specific manner in murine embryonic development.
Dev. Biol. 141, 451-455

Willecke, K., Hennemann, H., Dahl, E., Jungbluth, S., Heynkes, R. (1991): The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins.
Eur. J. Cell Biol. 56 (1), 1-7, review

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Rumoaldi, A., Guldennagel, M., Deutsch, U., Sohl, G. (2002): Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome.
Biol. Chem. 383 (5), 725-737, review

Winterhager, D., Grümmer, R., Jahn, E., Willecke, K., Traub, O. (1993): Spatial and temporal expression of connexin 26 and connexin 43 in rat Endometrium during trophoblast invasion.
Dev. Biol. 157, 399-409

Winterhager, E., Reuss, B., Hellmann, P., Spray, DC, Grümmer, R (1996): Gap junction and tissue invasion: a comparison of tumorigenesis and pregnancy. Clinical and experimental pharmacology and physiology 23, 1058-106

Yan, Y.T., Stein, S.M., Ding, J., Shen, M.M., Abate-Shen, C. (2000): A novel PF/PN motif inhibits nuclear localization and DANN binding activity of the ESX1 homeoprotein. Mol. Cell Biol. 20 (2), 661-671

Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kuroiwa, A. (1995): Coordinated expression of Abd-B subfamily genes HoxA cluster in the developing digestive tract of chick embryo. Dev. Biol. 169 (1), 76-89

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Elke Winterhager für die Bereitstellung des Themas sowie die hervorragende Betreuung bei der hier vorliegenden Dissertation.

Ein ebenso herzliches Dankeschön an Dr. Heinz Dieter Gabriel, der mich in die Laborarbeit sowie in die Technik der Gewinnung der Implantationskammern und der Blastozysten eingeführt hat und mir bei Schwierigkeiten mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Auch Georgia Rauter gebührt mein Dank für die hervorragende Unterstützung bei der Herstellung der Paraffinschnitte.

Dave Kittel danke ich für die Unterstützung bei der Bildbearbeitung und Erstellung der Schemata.

Für die Bereitstellung der Mäuse gilt mein Dank den Mitarbeitern des Tierlabors des Universitätsklinikums Essen.

Allen, die mir mit Ratschlägen, Tipps und Tricks zur Seite gestanden sind, ein herzliches Dankeschön – vor allem an Peter Helbig für die Unterstützung beim Druck der Dissertation. Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund Bastian für die Aufmunterungen und den Zuspruch, die bei Rückschlägen bei der Laborarbeit hin und wieder notwendig waren, danken.

Lebenslauf

Nadine Melanie Ising

Geburtsdatum-, ort: 14. Februar 1976 in Essen

Wohnort: Schwetzingen

Eltern: Norbert Ising
Gabriele Ising, geb. Körber

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982 - 1986 Grundschule Essen-Burgaltendorf

1986 - 1995 Besuch der Carl-Humann-Schule in Essen - Steele,
Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife

Universitäre Ausbildung, nebenberufliche und berufliche Tätigkeiten:

August 1994 – April 1996 Aushilfskraft bei den Kliniken Essen-Mitte

15. Oktober 1995 bis

21. November 2002 Beginn des Medizinstudiums an der
Universität-Gesamthochschule Essen.
Abschluß des Medizinstudiums mit Ablegung des Dritten
Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Oktober 1996 – April 1997 Aushilfskraft bei der Freien Alten- und Krankenpflege e.V.

April – Oktober 1998 Freisemester im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation.

Oktober 1999 – August 2002 Unterrichtung von Anatomie und Physiologie, sowie
Mikrobiologie an der Katholischen Krankenpflegeschule Essen

April – Oktober 2001 Freisemester im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation

01. Januar 2003 Beginn der Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der
Klinik für Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Mannheim